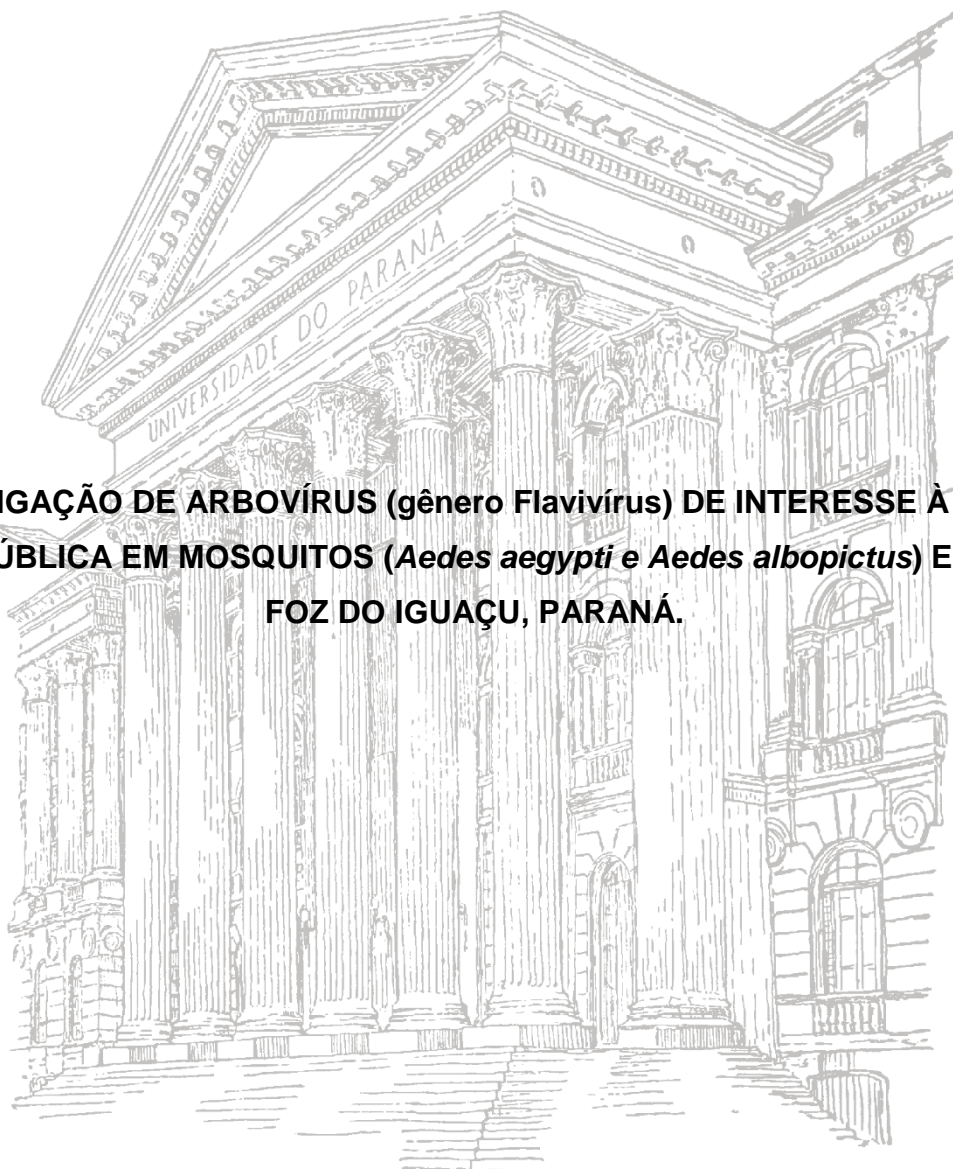


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO RODRIGUES GÓIS

**INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (gênero *Flavivirus*) DE INTERESSE À SAÚDE
PÚBLICA EM MOSQUITOS (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) EM
FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ.**



CURITIBA

2017

FERNANDO RODRIGUES GÓIS

**INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (gênero Flavivírus) DE INTERESSE À SAÚDE
PÚBLICA EM MOSQUITOS (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) EM
FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ.**

Dissertação apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Walfrido Kühl Svoboda

CURITIBA

2017

Góis, Fernando Rodrigues

Investigação de arbovírus (gênero Flavivírus) de interesse à saúde pública em mosquitos (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) em Foz do Iguaçu, Paraná / Fernando Rodrigues Góis - Curitiba, 2017.

81 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes

Coorientador: Professor Dr. Walfrido Kühl Svoboda

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Flavivírus. 2. *Aedes*. 3. Georreferenciamento. 4. Saúde pública. I. Gomes, Eliane Carneiro. II. Svoboda, Walfrido Kühl. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 614.4323

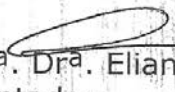


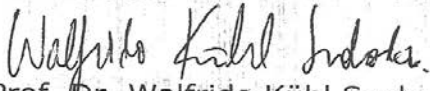
TERMO DE APROVAÇÃO

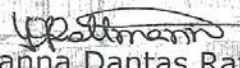
FERNANDO RODRIGUES GOIS

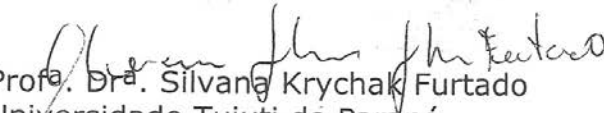
Título: "INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (gênero Flavivírus) DE INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA EM MOSQUITOS (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) em FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof.ª. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Orientadora


Prof. Dr. Walfrido Kühl Svoboda
Co-orientador


Prof.ª. Dra. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná


Prof.ª. Dra. Silvana Krychak Furtado
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 23 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho
À Kauana, minha esposa
Aos meus pais Dulcéia e Angelus

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes por todas as orientações, ensinamentos e incentivo transmitidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho pela contribuição no meu crescimento acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda, pelas contribuições indispensáveis, mesmo distante se mostrou presente e com orientações pontuais que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Navarro Silva pela confiança, incentivo, conselhos e pela disponibilização da infraestrutura que foi indispensável para a realização deste trabalho.

À doutoranda Tatiana Carneiro da Rocha pelo auxílio na execução e contribuição na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Ms. André Souza Leandro, do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu, pelo envio dos mosquitos para realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Saúde Pública e Ambiental da Universidade Federal do Paraná e todos os seus integrantes, onde foi o começo e fim dessa jornada.

Ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná e todos os seus integrantes pela acolhida e contribuições.

Aos meus amigos do mestrado “Gestão Underground” pela convivência, companheirismo e incentivo.

À Deus e minha família pelo amor incondicional e pelo apoio irrestrito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a construção e conclusão deste trabalho.

É melhor prevenir do que remediar

Autor desconhecido

RESUMO

Arbovírus são vírus essencialmente transmitidos por artrópodes, como os mosquitos, onde se enquadram os mosquitos do gênero *Aedes* em especial as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. As arboviroses destacadas nesse estudo são as causadas por Flavivírus, mais especificamente o vírus da Dengue e vírus da Zika, ambos representam um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Esta situação requer estudos para identificação destes vírus em seus vetores, possibilitando a previsão de epidemias em humanos. A implantação de técnicas moleculares, junto ao georeferenciamento pode ser uma estratégia importante no papel de diagnóstico de Flavivirus e seu controle em determinada região. O objetivo deste trabalho foi a investigação de arbovírus (gênero Flavivírus) de interesse à saúde pública em mosquitos (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) em Foz do Iguaçu no estado do Paraná. Com o uso da técnica de RT-PCR, foi feita a detecção dos vírus, em 21 pools analisados. Destes 15 apresentaram resultados positivos para Flavivirus, com a utilização de primers genéricos, todas as armadilhas foram georreferenciadas assim gerando um mapa com áreas de risco de transmissão. Toda técnica de identificação e georreferenciamento pode ser difundida e utilizada em outras regiões auxiliando os serviços de saúde pública na elaboração de estratégias de prevenção e controle destas doenças.

Palavras chave: Flavivírus, RT-PCR, *Aedes*, georreferenciamento

ABSTRACT

Arboviruses are viruses whose transmission occurs mainly due arthropods such as mosquitoes, where mosquitoes of the *Aedes* genus, especially the species *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, are found. The diseases caused by arboviruses highlighted at the present study are caused by Flavivirus, specifically Dengue virus and Zika virus. Both of them represent a serious public health problem in Brazil and worldwide. This situation craves for studies on these viruses identification and their vectors, enabling human epidemics to be predicted. To stablish molecular techniques, together with georeferencing, might be an important strategy to diagnose and control Flavivirus in a certain region. The aim of this study was to investigate arboviruses (Dengue and Zika) relevant to public health at mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*) in Foz do Iguaçu city, in the state of Paraná. RT-PCR technique was used to detect viruses. At the 21 analyzed pools, 15 of them presented positive results for Flavivirus using generic primers. All traps were georeferenced, creating a map of the risk of transmission areas. The whole technique of identification and georeferencing can be used by and disseminated to other regions, helping public healthcare services to develop strategies to prevent and control of these diseases.

Keywords: Flavivirus, RT-PCR, *Aedes*, georeferencing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 REPRESENTAÇÃO DE UM VÍRUS DO GÊNERO FLAVIVIRUS	10
FIGURA 2 REPRESENTAÇÃO DE UMA OPEN READING FRAME (ORF) DE FLAVIVIRUS	13
FIGURA 3 ORF DE UM FLAVIVIRUS E SUAS PROTEÍNAS CODIFICADAS	14
FIGURA 4 ARVORE FILOGENÉTICA ADAPTADA PARA DENV E ZIKV.....	15
FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DOS FLAVIVÍRUS.....	16
FIGURA 6 CIRCULAÇÃO DO FLAVIVÍRUS, DO VETOR AO RESERVATÓRIO NATURAL; VETOR AO HOSPEDEIRO; VETOR AGINDO COMO RESERVATÓRIO.	18
FIGURA 7 SINTOMAS CLÍNICOS TÍPICOS DA ZIKA.....	21
FIGURA 8 COMPARATIVO DO PERÍMETRO CEFÁLICO ENTRE RECÉM-NASCIDO NORMAL E COM MICROCEFALIA	22
FIGURA 9 SINTOMAS CLÍNICOS TÍPICOS DA DENGUE.....	24
FIGURA 10 ESQUEMA REPRESENTANDO A EVOLUÇÃO DOS GRAUS SINTOMÁTICOS DA DENGUE	25
FIGURA 11 ESQUEMA REPRESENTANDO AS CAUSAS RELATADAS PELAS INFECÇÕES POR DENGUE.....	25
FIGURA 12 RAMO FILOGENÉTICO DO DENV E ZIKV	27
FIGURA 13 ARVORE FILOGENÉTICA ADAPTADA PARA O Aedes Aegypti e Aedes albopictus.	28
FIGURA 14 CICLO REPRODUTIVO DOS MOSQUITOS Aedes.....	30
FIGURA 15 REPRESENTAÇÃO MORFOLÓGICA APROXIMADA DE MOSQUITOS <i>Aedes</i> <i>Aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	31
FIGURA 16 CASOS REPORTADOS DE ZIKA E DENGUE NO MUNDO NO PERÍODO DE 01/01/2015 A 31/12/2015.....	35
FIGURA 17 CASOS REPORTADOS DE ZIKA NO BRASIL EM 2014 ,2015 E 2016	37
FIGURA 18 CASOS REPORTADOS DE DENGUE NO BRASIL EM 1995, 2008, 2015 E 2016	38
FIGURA 19 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO PROJETO.....	44
FIGURA 20 CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU E SUAS FRONTEIRAS ENTRE OS PAÍSES ARGENTINA, BRASIL E PARAGUAI.....	45
FIGURA 21 REPRESENTAÇÃO GEOGRÁFICA DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU EM RELAÇÃO AO BRASIL E AO ESTADO DO PARANÁ.....	46
FIGURA 22 CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU VISUALIZADA VIA SATÉLITE	46
FIGURA 23 IMAGEM REAL AO LADO DO ESQUEMA ESTRUTURAL DA ARMADILHA ADULTRAP®	47
FIGURA 24 MOSQUITOS COLETADOS NA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU ARMAZENADOS EM TUBOS DE ENSAIO	48
FIGURA 25 GRUPO DE MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU E IDENTIFICADOS POR EXTRATOS.....	49
FIGURA 26 MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU DEPOSITADOS EM MICROTUBOS PARA MACERAÇÃO E FORMAR OS POOLS	50
FIGURA 27 TRIAGEM DOS MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU EM MESA REFRIGERADA.....	51
FIGURA 28 MACERAÇÃO COM PISTILO DOS MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU	52
FIGURA 29 COLUNA COM RNA EXTRAÍDO PARA QUANTIFICAÇÃO NO LABORATÓRIO DE ENTOMOLOGIA MÉDICA E VETERINÁRIA - UFPR.....	53

FIGURA 30 DADOS PLOTADOS NO SOFTWARE QGIS	55
FIGURA 31 CARTA GEOREFERENCIADA DE FOZ DO IGUAÇU E ESTRATO POSITIVO E NEGATIVO AMPLIADO	56
FIGURA 32 REDE DE CONHECIMENTO E COLETA DE MATERIAL DO PROJETO.....	57
FIGURA 33 MAPA DE CALOR DAS ARMADILHAS POSITIVAS.....	60
FIGURA 34 SIMULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU EM SITUAÇÃO DE CONTAGIO EM PONTOS DE INTERESSE.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 GRUPOS DE RISCO DE DENGUE.....	26
TABELA 2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PESSOAS COM DENGUE OU ZIKA	41
TABELA 3 IDENTIFICAÇÃO DO POOL DE MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU E A QUANTIDADE DE MOSQUITOS UTILIZADOS NO POOL	50
TABELA 4 IDENTIFICAÇÃO DO POOL E SEU RESULTADO POSITIVO OU NEGATIVO PARA FLAVIVÍRUS EM MOSQUITOS DE FOZ DO IGUAÇU.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE - Agente de Controle de Endemias

AVE - Tampão de Eluição

DENV - Dengue vírus

DNA - Deoxyribonucleic acid

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NS - Proteína não estrutural

ORF - Open reading frame

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PAHO - Pan American Health Organization

PCR - Polymerase Chain Reaction

QGIS - Quantum Geographic Information System

RNA - Ribonucleic acid

rpm - rotações por minuto

RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SRC - Sistema de Referência de Coordenadas

SUS - Sistema Único de Saúde

UBV - Ultrabaixo Volume

UFPR - Universidade Federal do Paraná

ZIKV – Zika vírus

WHO - World Health Organization

µL - microLitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVO GERAL.....	9
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 VIRUS.....	10
2.2 ARBOVIRUS.....	11
2.2.1 ARBOVIRUS GENERO FLAVIVIRUS.....	12
2.2.2 ARBOVIRUS DE IMPORTANCIA À SAUDE PUBLICA NO BRASIL	20
2.2.2.1 ZIKA	20
2.2.2.2 DENGUE	22
2.3 MOSQUITOS <i>Aedes</i>.....	27
2.4 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA DENV E ZIKV	34
2.4.1 DISTRIBUIÇÃO DA DENV E ZIKV NO BRASIL	36
2.5 COMBATE AO VETOR.....	39
2.6 DIAGNÓSTICO CLINICO PADRÃO.....	40
2.6.1 DIAGNÓSTICO POR MEIO DA BIOLOGIA MOLECULAR	41
2.7 GEORREFERENCIAMENTO NA SAÚDE	42
3 MÉTODO	44
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.2 LOCAIS DE ESTUDO	44
3.3 COLETA	47
3.4 PREPARO DOS MOSQUITOS	49
3.5 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	51
3.6 ANÁLISE POR RT PCR.....	53
3.7 GEOREFERENCIAMENTO.....	54
3.8 REDE DE CONHECIMENTO E COLETA DE MATERIAL	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6 REFERENCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus encontrados na natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos ou, de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode, através da via transovariana e, possivelmente, da via venérea; replicam-se e produzem viremia nos vertebrados, assim como nos tecidos dos artrópodes e são repassados a novos vertebrados suscetíveis através da picada do inseto, após um período de incubação o qual não faz parte da estrutura em que se encontra (WHO, 1985).

No Brasil, os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, com predomínio nas regiões tropicais, que oferecerem condições ecológicas favoráveis. Trinta e quatro dos 200 tipos diferentes de arbovírus e outros vírus de vertebrados, identificados na Amazônia brasileira, são comprovadamente patogênicos para o homem (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1989). Alguns arbovírus constituem sério problema, global ou regional, de saúde pública devido a expressiva morbidade e/ou mortalidade que ocasionam dentre os quais podemos destacar o Zika vírus (ZIKV) e o Dengue vírus (DENV) (CHEN; WILSON, 2010; CRUZ; VASCONCELOS, 2008; WHO, 1967).

Dengue vírus (DENV) e Zika vírus (ZIKV) são viroses exantemáticas que tem como via de transmissão mosquitos hematófagos como o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (SOUZA, 2010; WHO, 2015). ZIKV e DENV são capazes de sofrer mutações e/ou adaptar-se a novos ciclos zoonóticos e, assim, adquirir um maior potencial para emergir, estas arboviroses podem surgir como resultado de um ambiente em degradação e distúrbios sócio econômicos (WEAVER; REISEN, 2010).

Nos humanos, infecções causadas por flavivirus em geral apresentam sintomas iniciais inespecíficos, similar aos sintomas de outros arbovírus como: febre, dores articulares severas, dor de cabeça, dores musculares, dor retroocular, calafrios, tonturas, náuseas , fotofobia, erupção na pele, dor abdominal, leucopenia e trombocitopenia em casos específicos é registrado a presença de diarreia, dor garganta , congestão nasal , tosse e manifestações hemorrágicas (PINHEIRO et al., 1981; PINHEIRO, 1988; TAYLOR 2005; BRASIL, 2014; WHO, 2015).

Esses fatos, combinados com o fato de que um diagnóstico laboratorial de ZIKV e DENV é realizada apenas em alguns lugares, podem levar à errada impressão de

que os surtos causados por arbovirus não são presentes em regiões povoadas do Brasil (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de arbovírus de interesse a saúde pública (gênero Flavivírus) em mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que são transmissores de doenças, na cidade de Foz do Iguaçu, Paraná.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Verificar a circulação do Flavivírus em mosquitos *Aedes* adultos capturados em armadilhas e georreferenciar a área estudada, visando auxiliar na capacidade de anteceder ocorrências de casos humanos.

- *Estabelecer recursos de auxílio para a prevenção do avanço de mosquitos infectados na região estudada.

- *Aplicar técnicas de biologia molecular para investigação da presença do Flavivírus em mosquitos.

- *Contribuir com informações epidemiológicas sobre a circulação de Flavivírus em vetores biológicos nas regiões estudadas;

- *Fornecer subsídios aos serviços de saúde pública, para contribuir na prevenção e controle de epizootias e epidemias;

- *Verificar a distribuição geográfica dos vírus e mosquitos na região estudada em questão;

- *Apresentar ferramentas de controle e estratégia diferenciada no controle.

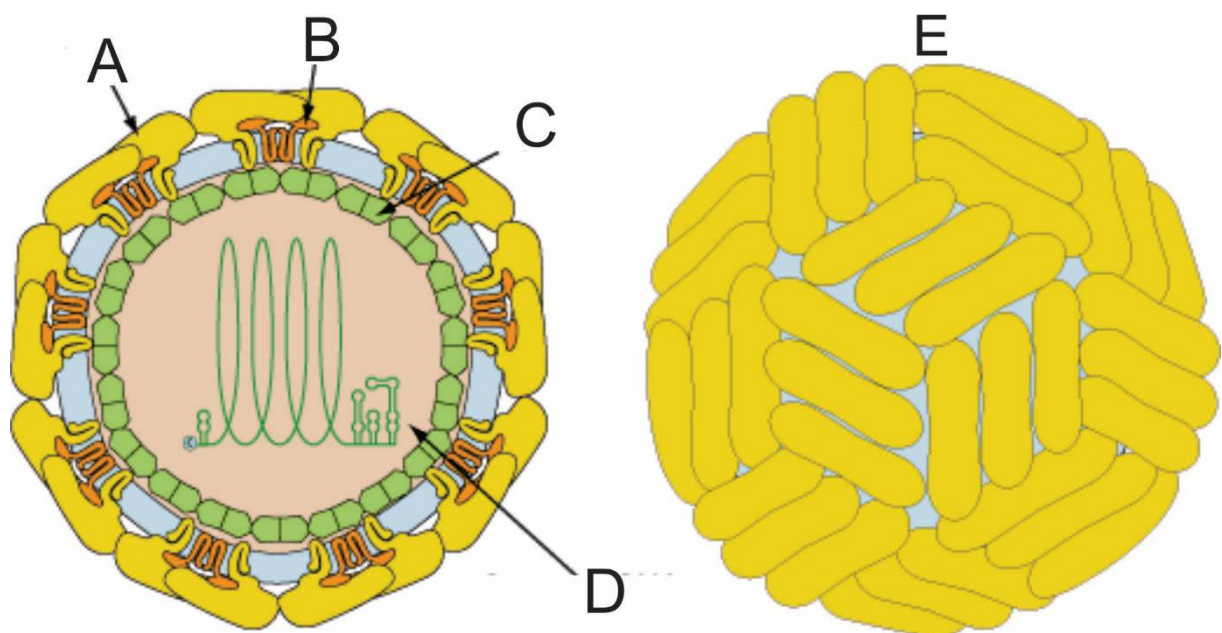
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VIRUS

Os vírus são agentes submicroscópicos que necessitam do metabolismo de células para sua síntese energética e proteica, bem como para multiplicação. Dessa forma são também denominados parasitas obrigatórios, já que só expressam valor biológico no meio intracelular. Em ambiente extracelular os vírus são apresentados como estruturas químicas inertes, embora possuam formação e função bem definidas. (CANN, 2005; FLORES, 2007).

Todas as formas de vida celular, seja eucariota (animais vertebrados, animais invertebrados, plantas, fungos) ou procarionte (bactérias e archaea) podem apresentar um ou mais tipos de infecção por vírus. (CARTER; SAUNDERS, 2007a; KNIPE et al., 2013). Em sua forma mais simples, a constituição viral é de apenas um pequeno segmento de ácido nucleico envolto por uma cápsula proteica simples. Seu tamanho é muito variável, partindo de 10 a 450 nm (CANN, 2005; CARTER; SAUNDERS, 2007a; FLORES, 2007; KNIPE et al., 2013; MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010), (FIGURA 1).

FIGURA 1 REPRESENTAÇÃO DE UM VÍRUS DO GÊNERO FLAVIVIRUS



LEGENDA: (A) Dímeros, (B) Proteínas, (C) Capsídeo Proteico, (D) Material Genético e (E) Estrutura externa com a junção dos dímeros.

FONTE: O autor (2016) adaptado de ViralZone (Instituto Suíço de Bioinformática) (2015).

Compreender a natureza dos vírus, seus mecanismos de replicação, como e por que causam doenças poderá gerar incontáveis avanços na área da saúde, como o desenvolvimento de meios para prevenção, diagnóstico e tratamento de patologias. A criação de vacinas, reagentes, técnicas de diagnóstico e produção de medicamentos antivirais são apenas alguns exemplos da gama de benefícios que estudos poderão trazer. (CARTER; SAUNDERS, 2007a).

2.2 ARBOVIRUS

O termo “arbovírus” origina-se da expressão inglesa *arthropod-borne viroses* (ARthropod - BORne vírus = ARBOvírus), que refere-se a um grupo de vírus que são transmitidos por artrópodes, e segue alguns requisitos para sua correta classificação: infectar vertebrados e invertebrados; iniciar viremia em hospedeiro vertebrado por tempo e quantidade suficientes para permitir infecção do vetor invertebrado e iniciar uma infecção produtiva; habitar a glândula salivar do invertebrado a fim de fornecer vírus para infecção de outros hospedeiros vertebrados; o meio de transmissão de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode através da via transovariana ou venérea (CASSEB et al., 2013; CRUZ; VASCONCELOS, 2008; WHO, 1985).

São reconhecidos com hospedeiros primários dos arbovirus os primatas humanos e os não humanos; e hospedeiros secundários são vertebrados como roedores, pássaros e pequenos mamíferos (PADBIDRI; GNANESWAR, 1979).

A distribuição geográfica é ampla, abrangendo quase todos os continentes (com exceção da Antártida), tanto em regiões temperadas como tropicais, predominando nessas últimas, pois certamente oferecerem condições ecológicas mais favoráveis (CASSEB et al., 2013; KNIPE et al., 2013; WHO, 1985). Surto de doenças causadas por arbovírus estão relacionados às populações acessíveis aos mosquitos transmissores da família *Aedes*; já as epidemias estão relacionadas à proporção de indivíduos acessíveis e que ficam infectados. Como os humanos são hospedeiros terminais que não agem como elos significativos de infecção, os principais determinantes são fatores ecológicos e climáticos como umidade do ar, pluviosidade e temperatura. (KNIPE et al., 2013; PADBIDRI; GNANESWAR, 1979; SILVA; ANGERAMI, 2008; WHO, 1985)

Assim como acontece em muitos casos com doenças de transmissão por arbovírus, os surtos são altamente dependentes da densidade de vetor, hospedeiros vertebrados e se o hospedeiro vertebrado é imunologicamente susceptível. É observado que em regiões endêmicas as infecções costumam ser subdiagnosticadas, o que ocasiona uma fragilidade na obtenção de dados.

Alguns estudos de sequenciamento revelaram a acúmulo de pontos de mutações que sugerem que as cepas virais que circulam atualmente derivam de um ancestral comum oriundo da África e Ásia (PRITCHARD; GOULD, 1995).

Os arbovírus patológicos para humanos e outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias: Bunyaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (FIGUEIREDO, 2007; RUST, 2012), e sua infecção ocorre da seguinte maneira: concomitante à picada pelo vetor, é realizada a inoculação do vírus, que é transportado por redes complexas de vasos e nódulos linfáticos, onde a replicação local acontece. Os vasos linfáticos transportam o fluido dos tecidos de para o sistema circulatório, a partir do qual órgãos alvos serão atingidos e também infectados (KNIPE et al., 2013).

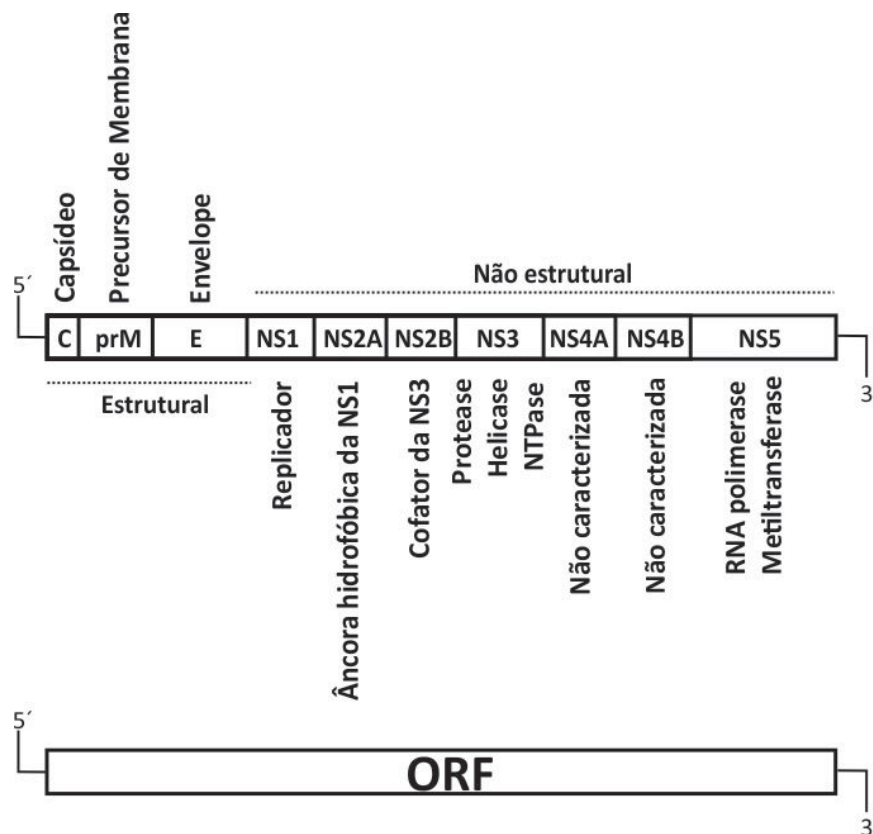
2.2.1 ARBOVIRUS GENERO FLAVIVIRUS

Os arbovirus apresentados a partir do gênero Flavivirus (família Flaviridae) mais conhecidos são: Febre Amarela (YFV), Dengue tipos 1 ao 4 (DENV), Encefalite Japonesa (JEV), Kokobera (KOKV), West Nile (WNV) e Zika (ZIKV). Eles medem de 40 a 60nm, são esféricos e possuem envoltório lipídico. Os vírus são recobertos por um capsídeo, e no seu interior uma simples fita de RNA com polaridade positiva. Seus RNAs correspondem aproximadamente a 11 quilobases (CANN, 2005; CARTER; SAUNDERS, 2007b; FIGUEIREDO, 2007; FLORES, 2007; KNIPE et al., 2013; KORSMAN et al., 2012; TEVA et al., 2009).

Seus genomas são baseados em uma ORF (Open Reading frame - Fase Aberta de Leitura) que consiste em uma série de trincas de nucleotídeos, iniciando com um códon de iniciação (geralmente uma metionina, ATG) e terminando em um códon de parada (TAA, TAG ou TGA, na maioria dos genomas), podem variar seus comprimentos conforme a serotipagem, codificando uma longa proteína que é posteriormente processada originando três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM/M (pré membrana) e E (envelope) que estão localizadas na extremidade aminoterminal

e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) se relacionam com a replicação do vírus, se localizam na carboxila extrema (CANN, 2005; CARTER; SAUNDERS, 2007b; KNIPE et al., 2013), (FIGURA 2).

FIGURA 2 REPRESENTAÇÃO DE UMA OPEN READING FRAME (ORF) DE FLAVIVIRUS

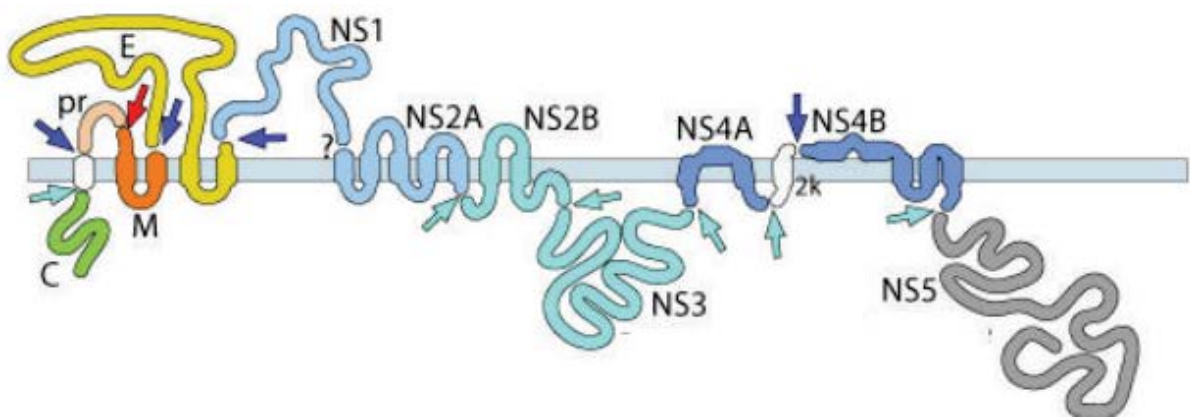


FONTE: O autor (2016) com adaptação de KNIPE (2013) e CARTER; SAUNDERS (2007)

É observado que as proteínas NS são responsáveis e indispensáveis para a correta replicação do RNA viral e também auxiliam na montagem viral e no escape da resposta imune do hospedeiro (DA SILVA NETO; WINTER; TERMIGNONI, 2013). A glicoproteína NS1 é necessária no processo de replicação do RNA viral, possui quatro atividades enzimáticas (serino protease, NTPase, helicase e RTPase)(DA SILVA NETO; WINTER; TERMIGNONI, 2013; QI; ZHANG; CHI, 2008). NS2A e NS2B são dois polipeptídeos hidrofóbicos, clivados por proteases virais. Durante a replicação viral, o genoma é traduzido em uma única poliproteína precursora, que deve ser clivada em proteínas individuais por um complexo de protease viral, NS3 é uma proteína multifuncional com atividades de uma serino-protease que tem NS2B como um cofator (BRECHER; ZHANG; LI, 2013; DA SILVA NETO; WINTER; TERMIGNONI,

2013). NS4A e NS4B são proteínas transmembranares altamente hidrofóbicas, que são responsáveis em parte da organização membranar levando à formação do complexo de replicação viral (NEMÉSIO; PALOMARES-JEREZ; VILLALAÍN, 2012). NS5 tem a função de uma RNA polimerase e RNA-dependente de outros vírus de RNA de polaridade positiva (DA SILVA NETO; WINTER; TERMIGNONI, 2013), (FIGURA 3).

FIGURA 3 ORF DE UM FLAVIVIRUS E SUAS PROTEÍNAS CODIFICADAS

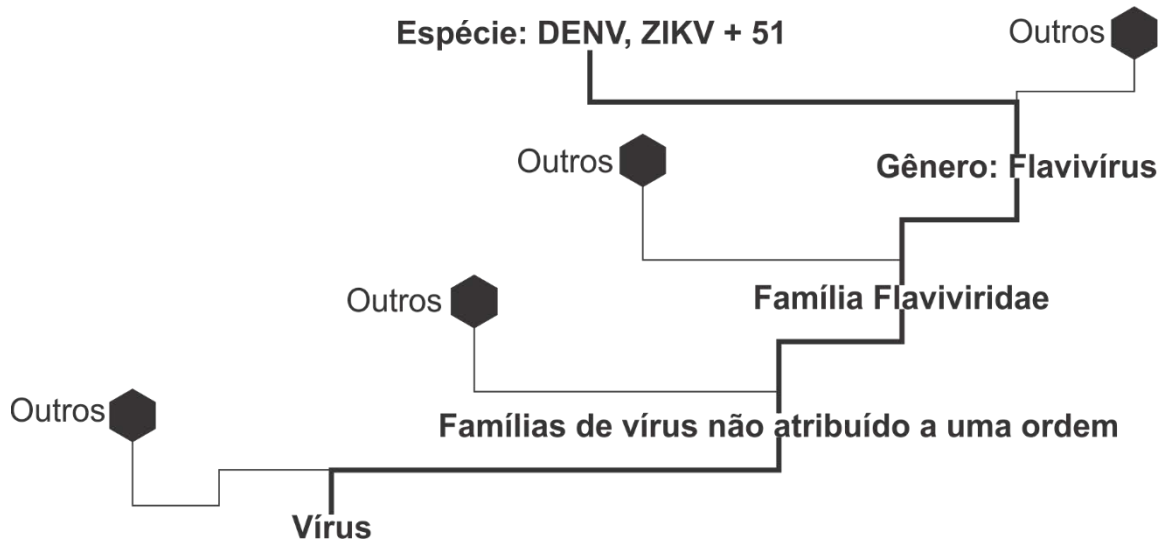


FONTE: ViralZone (Instituto Suíço de Bioinformática)(2015)

Atualmente a reemergência de Flavivírus é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. As razões para isto são complexas e não totalmente compreendidas. É destacado que a grande aquisição bens e descarte de rejeitos podem gerar fatores de risco para proliferação e para a disseminação passiva dos agentes transmissores, sob a forma de ovos ou larvas em recipientes contendo água. Seu período de transmissibilidade (ou viremia) é prolongado, pois o vírus pode ser detectado no sangue desde um a dois dias antes do aparecimento dos sintomas, até oito dias após o seu início, facilitando assim sua disseminação pelo mosquito vetor (GUBLER, 1998; TAUILL, 2001).

Segundo dados da International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), no grupo dos Flavivírus são encontradas 53 espécies. Também é observado nas espécies variados sorotipos (resposta imune) e dentro dos sorotipos diferentes genótipos (material herdado)(HENCHAL; PUTNAK, 1990), (Figura 4).

FIGURA 4 ARVORE FILOGENÉTICA ADAPTADA PARA DENV E ZIKV

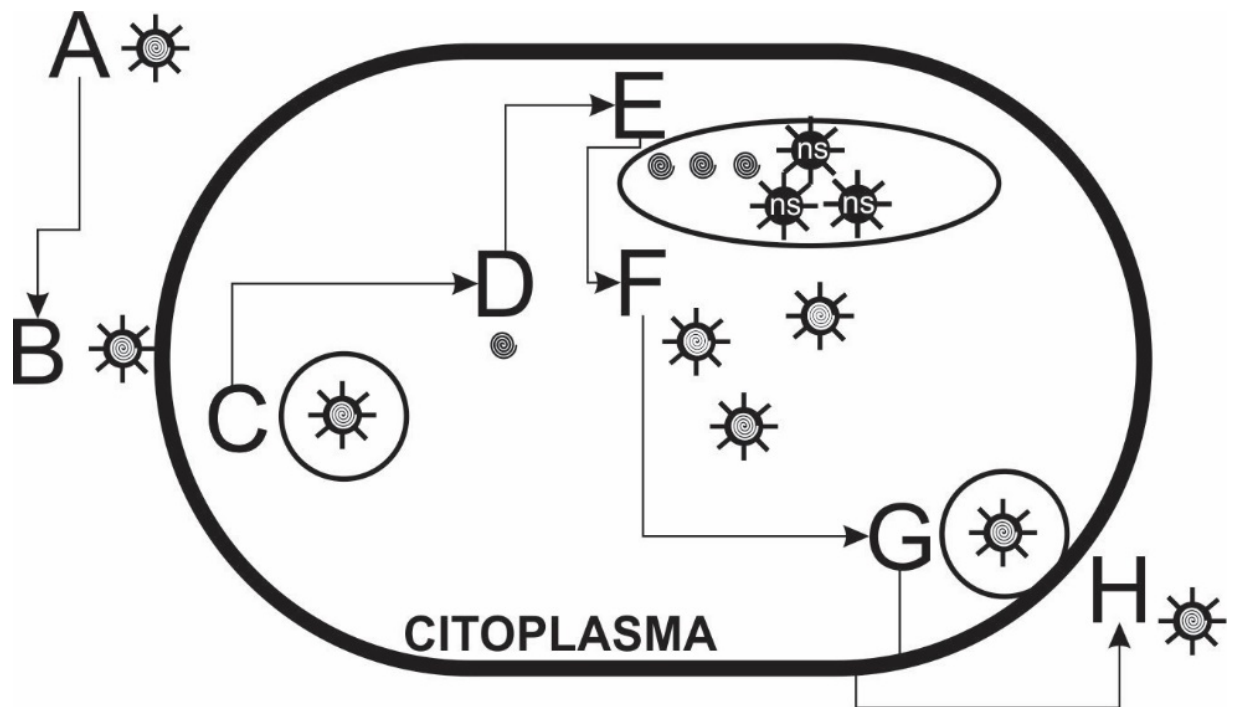


NOTA: AS linhas negritadas servem apenas para destacar os vírus abordados no presente trabalho, o uso do +51 representa que além no ramo que se encontra DENV e ZIKV pode ser encontrado mais 51 vírus diferentes.

FONTE: O autor (2016) com dados da International Committee on Taxonomy of Viruses (2016).

O mecanismo de ação dos flavivírus em termos gerais ocorre após o repasto do mosquito quando o vírus é transferido para o homem, a partir deste ponto é iniciada a infecção, os principais alvos dos vírus são monócitos, macrófagos e células dendríticas. A infecção por flavivírus é promovida com a interação da partícula viral com o receptor celular, após há endocitose e desnudamento, onde é feita a liberação do capsídeo e a liberação do RNA no citoplasma celular. Nos ribossomos é feita a tradução das proteínas virais, formação de novas fitas de RNA onde se encerra a replicação. Após a montagem de novas partículas virais estas são liberadas da célula por exocitose (CANN, 2005; KNIPE et al., 2013; PERERA; KUHN, 2008; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010), (FIGURA 5).

FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DOS FLAVIVÍRUS



LEGENDA: (A) Vírus livre, (B) Vírus realizando a fusão, (C) Vírus fagocitado, (D) Vírus desnudado, (E) Tradução/Replicação de material genético e formação das proteínas não estruturais (NS's), (F) Montagem, (G) Brotamento e (H) Vírus exocitado.

FONTE: O autor (2016) com base em KORSMAN (2012).

2.2.2 ARBOVIROSES

As arboviroses são viroses emergentes por natureza, já que nenhuma delas é originalmente uma doença humana. Elas só se tornam importantes quando ocorre alguma modificação ecológica significativa que altere seu habitat natural, levando a modificações de reservatórios, vetores e até mesmo virulência. (SILVA; ANGERAMI, 2008). Além disso, as arboviroses são também consideradas reemegentes, pois sua incidência na espécie humana tem aumentado nas últimas décadas, ou por existir a ameaça de aumentar num futuro próximo (CDC, 1994). A emergência e reemergência de arbovíroses são consideradas fenômenos naturais e apontadas como processo de

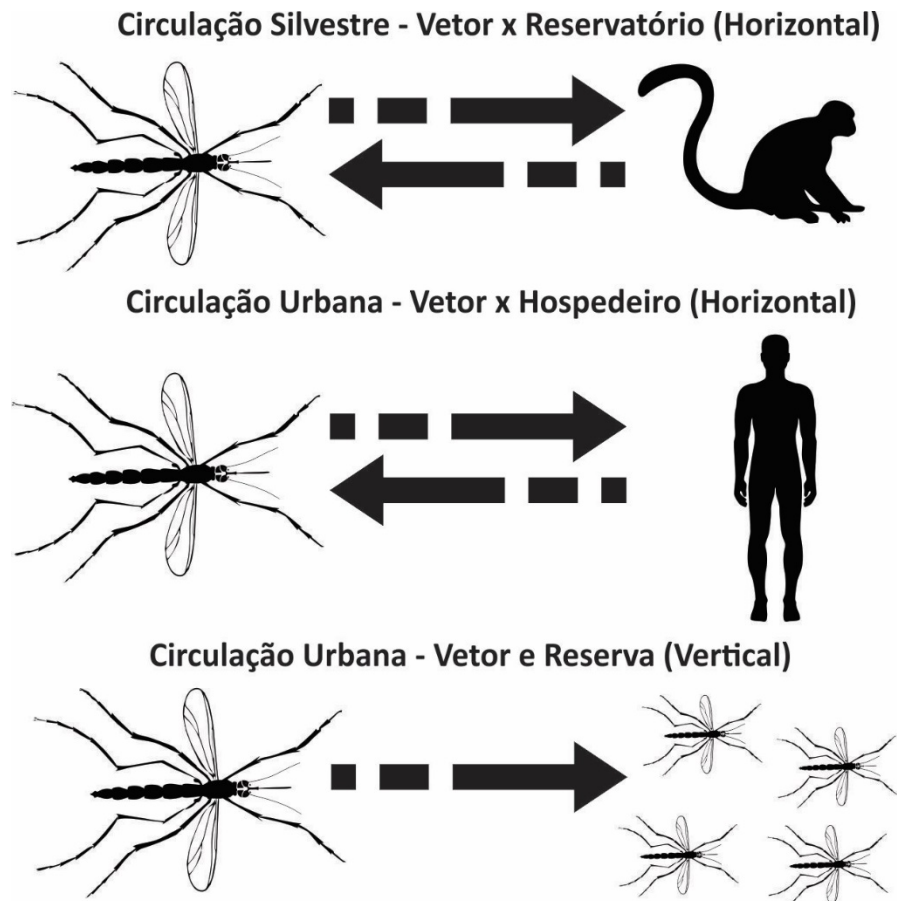
evolução e adaptação de espécies, pois durante a infecção de diferentes organismos o vírus pode adquirir maior viabilidade de infecção no hospedeiro gerando estirpes mais virulentas ou melhor adaptadas (CANN, 2005; CASSEB et al., 2013; FLORES, 2007).

As localidades com vegetação mais densa e com maiores índices de chuva durante determinado período de tempo são os ecossistemas mais ricos em arbovírus. Muito embora estejam presentes em praticamente qualquer ecossistema onde seja possível a presença de artrópodes, sendo encontradas também em savanas e cerrados. No Brasil, remanescentes da Mata Atlântica e a floresta Amazônica são os maiores reservatórios de arboviroses (SILVA; ANGERAMI, 2008). Os reservatórios de arboviroses são em sua grande maioria mantidos em ambiente silvestre, mas o homem em sua constante expansão acaba por ter contato com focos enzoóticos. Portanto é na presença do homem em áreas silvestres que há o maior risco de infecção. Contudo, é observado que algumas arboviroses vêm surgindo em áreas urbanas sob forma epidêmica (GUBLER et al., 2014; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1989).

A transmissão se faz pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*, a transmissão mecânica também é possível, quando a fonte de alimentação é limitada, o mosquito busca se alimentar em hospedeiro vulnerável próximo. É importante destacar que transmissão por contato direto com um doente não é evidenciada, nem por contato com água ou alimentos (BRASIL, 2008).

A circulação de arboviroses pode ocorrer por diferentes mecanismos, como o repasto de sangue contaminado do hospedeiro vertebrado (transmissão horizontal), transovariana e transmissão venérea (transmissão vertical) (BEATY; STEPHEN, 2005) (FIGURA 6).

FIGURA 6 CIRCULAÇÃO DO FLAVIVÍRUS, DO VETOR AO RESERVATÓRIO NATURAL; VETOR AO HOSPEDEIRO; VETOR AGINDO COMO RESERVATÓRIO.



FONTE: O autor (2016) baseado em CASSEB (2013) e BEATY (2005).

A transmissão de arboviroses é aumentada quando mosquito habita o mesmo ambiente do hospedeiro vertebrado ocasionando maior contato entre as espécies gerando maior longevidade ao mosquito, pois quanto maior o tempo de vida, mais vezes ocorrerão o repasto e oviposição (GUEDES; AYRES, 2012).

Boa parte das arboviroses são causadas por RNA vírus, e durante a transcrição do RNA ocorrem altas taxas de erro que geram mutações genômicas, como consequência de falhas cometidas pela polimerase viral.(CANN, 2005; CARTER; SAUNDERS, 2007a; KNIPE et al., 2013) A população resultante é muitas

vezes referida diferente da espécie original. Em cada ciclo são produzidos vírus mutantes, que por isso são denominados de quasiespécies. Outra causa de mutação dos vírus de RNA é a recombinação do genoma, que pode ocorrer se houver uma infecção simultânea do animal por mais de um vírus da mesma família ou gênero (CANN, 2005; FIGUEIREDO, 2007). Por serem mais susceptíveis a mutações e, portanto, à adaptação a novos hospedeiros ou vetores (SILVA; ANGERAMI, 2008), os RNA vírus são conhecidos de longa data como forma de geração de novos padrões genômicos. Alterações ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência do vetor, criando novos reservatórios ou induzir arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Além disso, arboviroses com o auxílio não proposital do homem, podem viajar grandes distâncias e entrar em novos países ou mesmo continentes, com grande potencial de gerar pandemias (BRASIL, 2010; FIGUEIREDO, 2007; PADBIDRI; GNANESWAR, 1979; SCHATZMAYR, 2001; WHO, 1985).

A necessidade de vetores para o contágio de muitas das viroses emergentes e reemergentes se inicia com introdução de elementos ecológicos que podem ser melhor observados em países de clima tropical, que se mostra facilitador para mecanismos de mutação e recombinação genéticas dos arbovírus. Ainda que as doenças infecciosas emergentes possam ser determinadas por qualquer tipo de microrganismo, as arboviroses merecem uma atenção diferenciada, não só pelo seu maior número e diversidade, mas também pela replicação viral ocorrer numa intensidade e velocidade maiores do que bactérias, protozoários ou fungos (SCHATZMAYR, 2001; SILVA; ANGERAMI, 2008).

Para o surgimento de uma arbovirose, a mesma deve preencher um ou mais requisitos que podem estar associados: ter o surgimento de vírus desconhecido pela evolução de nova variante viral; ter introdução no hospedeiro de um vírus existente em outra espécie (transposição da barreira de espécie); fazer disseminação de determinado vírus a partir de uma pequena população humana ou animal, na qual este vírus surgiu ou em que foi originalmente introduzido. (MORSE, 1995).

Existe grande probabilidade de um aumento na diversidade genética dos vírus que podem gerar grandes problemas no sistema de saúde pública, essa escalada de diversidade genética geram novas patologias, aumento de transmissão, viremia e virulência (WEAVER; VASILAKIS, 2009)

2.2.2 ARBOVIRUS DE IMPORTANCIA À SAUDE PUBLICA NO BRASIL

2.2.2.1 ZIKA

O Zika vírus é um vírus RNA de fita simples transmitido por mosquitos que causam uma doença febril aguda leve semelhante à dengue. Em 1947, os cientistas que pesquisam sobre febre amarela na Floresta de Zika, um estreito e denso de grandes árvores com copas descontínuas, à margem do Lago Victoria, a 25km da capital de Kampala (Uganda). Encontraram em um macaco rhesus uma febre se desenvolvendo. A partir do seu isolamento os pesquisadores chegaram à conclusão que se tratava de uma nova espécie de vírus e a chamaram de Zika vírus que significa “coberto” no idioma local. Desde a sua descoberta até 2007, os casos confirmados de infecção por vírus Zika eram raros (DICK, 1952; HAYES, 2009; RASMUSSEN et al., 2016).

Uma análise filogenética demonstrou que o ZIKV pode ser classificado em linhagens diferentes, africanas e asiáticas, é sugerido que ambas surgiram na África do Norte entre 1800 a 1900 (GATHERER; KOHL, 2016)

O ZIKV foi negligenciado por muitos anos, e não houve esforços efetivos para o desenvolvimento de vacinas ou tratamentos, pois, o número de casos era considerado de baixo impacto clínico em relação a outros arbovírus. A situação mudou a partir de 2007 nas ilhas de Yap na Micronésia, onde ocorreu um grande surto de Zika (LANCIOTTI et al., 2008).

No início de 2014 foi reportado o vírus na Ilha de Páscoa, sendo considerado o primeiro caso da doença em continente americano (MUSSO; NILLES; CAOLORMEAU, 2014). Em 2015 foi confirmada a circulação do vírus no Brasil a partir de isolamento viral em casos suspeitos de dengue e também a sua co-circulação com outros arbovírus o que despertou os órgãos de vigilância em saúde de possível surto da doença. (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

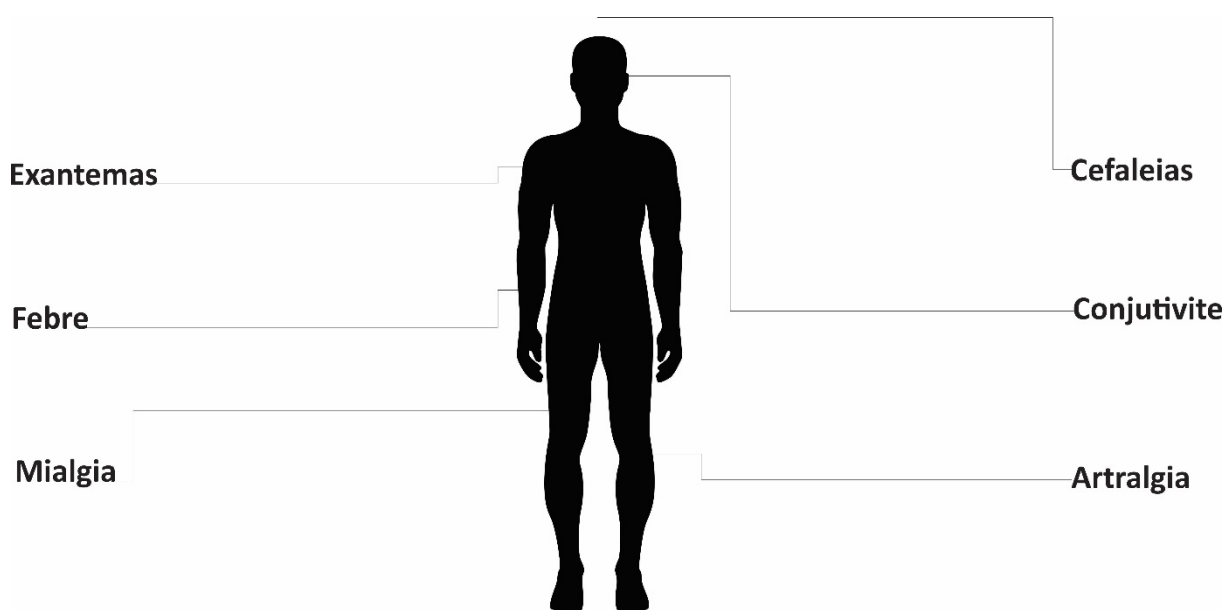
A transmissão do ZIKV normalmente ocorre durante o repasto de mosquitos *Aedes*, mas há evidencias de transmissão do vírus por via congênita (OLIVEIRA MELO et al., 2016), via perinatal (BESNARD et al., 2014). Também há relatos de

transmissão via sexual, (MUSSO et al., 2015), via transfusão sanguínea (MUSSO et al., 2014), mordida de macacos (LEUNG et al., 2015), saliva e urina (BONALDO et al., 2016), suor e lágrimas (SWAMINATHAN et al., 2016).

O diagnóstico diferencial é feito principalmente para dengue e chikungunya (IOOS et al., 2014), após o descarte das mesmas é incluído um teste para zika.

Muitas pessoas infectadas com o ZIKV não manifestam sintomas ou serão de uma forma branda, seus sintomas mais comuns são: febre, exantemas, artralgias, conjuntivite, mialgia e dor cefaleias com duração máxima de uma semana. Em geral os sintomas não incomodam o suficiente para se buscar atendimento médico (CDC/EUA, 2015), (FIGURA 7).

FIGURA 7 SINTOMAS CLINICOS TÍPICOS DA ZIKA

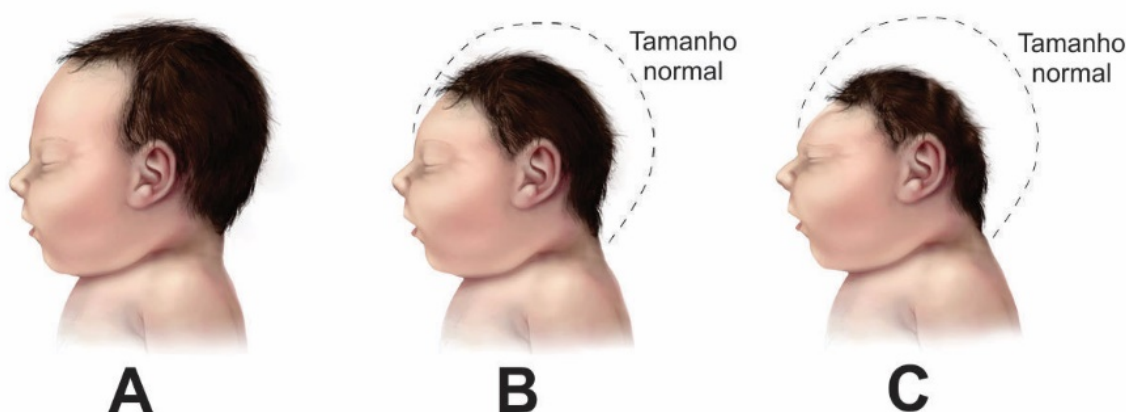


FONTE: O autor (2016) com dados de BADEN (2016), CDC – EUA (2015) e GATHERER (2016)

Os maiores afetados pelo ZIKV, são gestantes onde o vírus consegue infectar também o feto retardando seu pleno desenvolvimento (DRIGGERS et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016; SOARES DE OLIVEIRA-SZEJNFELD et al., 2016). Sendo relatado o comprometimento de 40% do desenvolvimento cerebral (GARCEZ et al., 2016), ocasionando a microcefalia. Esta é diagnosticada após o nascimento, pelo perímetro cefálico. Para meninos, a medida será igual ou inferior a 31,9

centímetros e, para meninas, igual ou inferior a 31,5 centímetros. Existe também a microcefalia chamada de grave onde o perímetro cefálico é ainda mais reduzido (BARTON; SALVADORI, 2016; MLAKAR et al., 2016), (FIGURA 8).

FIGURA 8 COMPARATIVO DO PERÍMETRO CEFÁLICO ENTRE RECÉM-NASCIDO NORMAL E COM MICROCEFALIA



LEGENDA: (A) Recém-nascido considerado normal, (B) Recém-nascido com microcefalia e (C) Recém-nascido com microcefalia grave.

FONTE: CDC – EUA (2016), adaptado pelo autor (2016)

O ZIKV também foi relacionado à síndrome de Guillain-Barret, um distúrbio neurológico imune que ocorre quando muitos nervos periféricos de todo o corpo param de funcionar provocando quadro de paralisia flácida aguda. Seu mecanismo em relação com o ZIKV não foi totalmente elucidado (BRASIL et al., 2016; OEHLER et al., 2014).

Até a presente data não há registros de testes comerciais exclusivos para o ZIKV. O mais próximo e preciso é o uso da PCR (BALM et al., 2012).

2.2.2.2 DENGUE

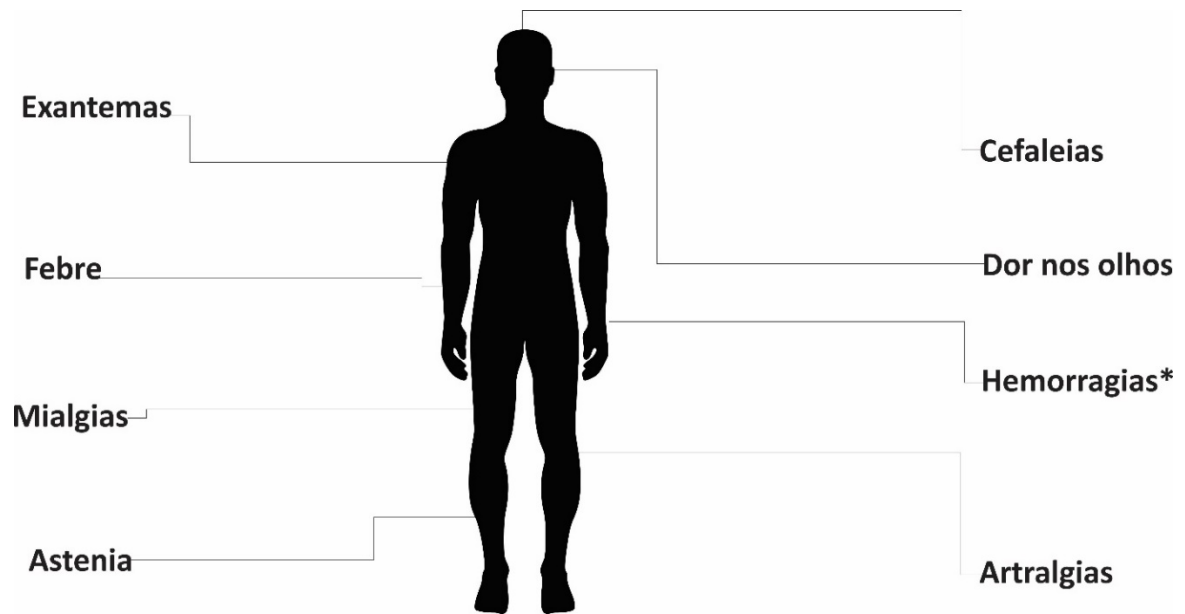
O dengue é uma doença febril transitória, cujos sintomas preliminares são dor de cabeça, dor nos olhos, dor nas costas, dores musculares e articulares e erupções cutâneas. O vírus detém quatro sorotipos diferentes (tipos 1,2,3 e 4). Na transmissão silvestre, a qual envolve animais, os primatas são os hospedeiros principais, enquanto o homem é hospedeiro acidental. Não é relatado a existência de imunidade cruzada,

logo a infecção por um dos sorotipos só confere imunidade humoral por longos períodos ou permanente para aquele sorotipo, porém existe a possibilidade de imunidade cruzada transitória, de curta duração, entre os diferentes sorotipos. (CHEN; WILSON, 2010; KORSMAN et al., 2012; TAUIL, 2001).

Pessoas acometidas por uma reinfecção com sorotipo diferente ficam à mercê de um grau mais grave da dengue chamado de dengue hemorrágica, onde a característica chave é o extravasamento capilar, trombocitopenia, quadros hemorrágicos que progridem ao choque (BROOKS et al., 2014).

As manifestações clínicas por dengue tem o período de incubação que varia de 3 a 14 dias, onde podem ser divididas em Febre do Dengue, a forma mais branda da doença, que ainda sim é debilitante, sendo caracterizada por fortes períodos de febre e um conjunto de sintomas como: cefaleias, mialgias, dor retrorbitária, náuseas, artralgias, astenia e exantema, a tendência é de cessar por completo os sintomas em até 10 dias (MAIRUHU et al., 2004), (FIGURA 9). Febre Hemorrágica do Dengue onde os sintomas são muito parecidos aos anteriores porém ocorre o aparecimento de sangramentos espontâneos (MALAVIGE et al., 2004), já a manifestação da Síndrome de Choque por Dengue é o maior grau de manifestação da doença ocorrendo devido a um colapso circulatório onde há um grande extravasamento de plasma, fazendo o paciente entrar em choque hipovolêmico. Pode ser letal se o extravasamento ultrapassar 20% do volume sanguíneo total (SENEVIRATNE; MALAVIGE; DE SILVA, 2006).

FIGURA 9 SINTOMAS CLÍNICOS TÍPICOS DA DENGUE

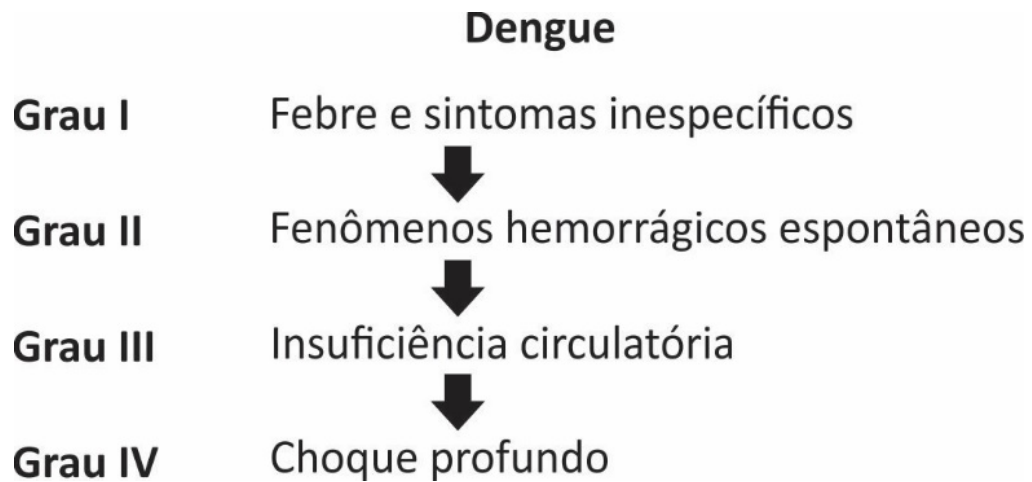


.NOTA: *sintoma da Dengue Hemorrágica

Fonte: o autor (2016) com dados de GUBLER (2014) e WHO (2012)

O quadro sintomático da dengue também pode ser classificado em uma forma de graus de severidade da doença: grau I, II, III e IV, onde no grau I é relatado febre e sintomas inespecíficos; para a manifestação hemorrágica é feita a prova do laço positivo (onde é encontrado mais de 20 petéquias) e/ou a equimose fácil, grau II é a presença de fenômenos hemorrágicos espontâneos, grau III vem a insuficiência circulatória manifesta por pulso fraco e rápido, redução da pressão de pulso a 20 mmHg, hipotensão, pele pegajosa e fria, agitação, por último o grau IV consiste em choque profundo caracterizado por ausência de pulso e pressão arterial (WHO, 2009, 2012) (FIGURA 10).

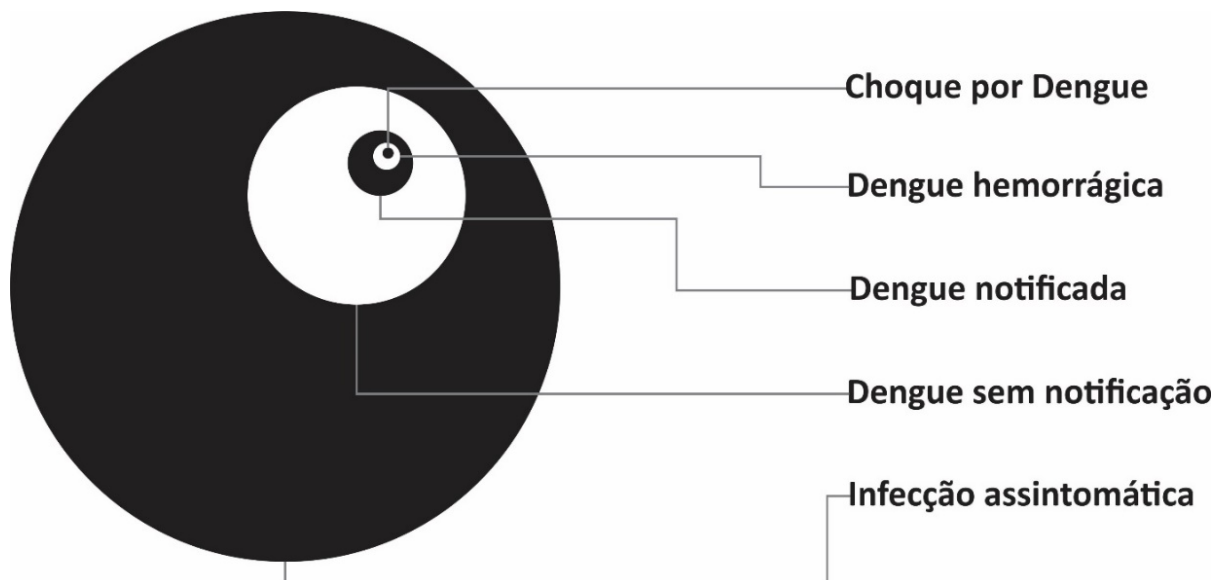
FIGURA 10 ESQUEMA REPRESENTANDO A EVOLUÇÃO DOS GRAUS SINTOMÁTICOS DA DENGUE



Fonte: O autor (2016) baseado em WHO (2012)

As causas relatadas e notificadas podem ser esquematizadas segundo a figura 11.

FIGURA 11 ESQUEMA REPRESENTANDO AS CAUSAS RELATADAS PELAS INFECÇÕES POR DENGUE



FONTE: O autor (2016) com dados de GUZMAN (2010) e KYLE (2008)

O ministério da saúde classifica o risco de dengue em grupo que vão de A a D. Esses grupos são conhecidos a partir do critério de triagem como manifestações clínicas e manejo clínico (TABELA 1).

TABELA 1 GRUPOS DE RISCO DE DENGUE

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Sem sangramentos; Sem sinal de alarme; Sem risco social; Sem comorbidades	Com sangramento ou condição risco social, ou comorbidades; Sem sinal de alarme	Presença de algum sinal de alarme; Manifestação hemorrágica presente ou ausente	Com sinais de choque; Desconforto respiratório; Hemorragia grave; Disfunção grave de órgãos; Manifestação hemorrágica presente ou ausente
Ambulatorial	Em observação até resultado dos exames	Leito de internação por no mínimo 48h	Leito de terapia intensiva
<div> <div>Acompanhamento</div> <div>Clínica</div> </div>			

FONTE: O autor (2016) com dados do Ministério da Saúde – BRASIL (2013)

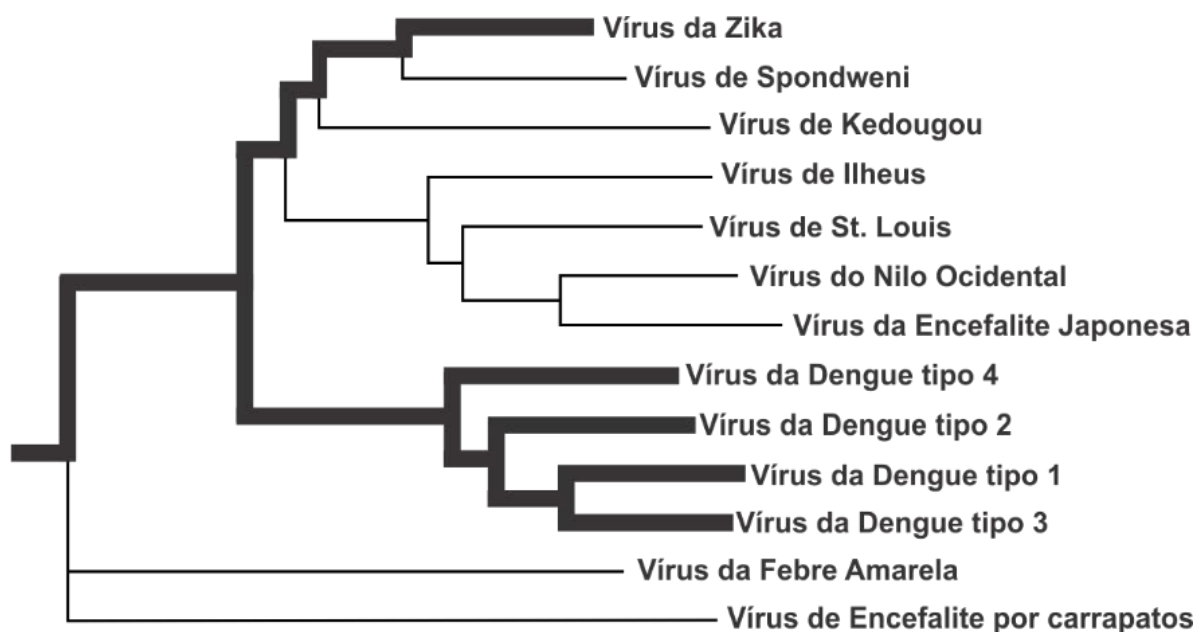
Existem relatos de sintomas que caracterizam a dengue na enciclopédia chinesa publicada durante a Dinastia da China Jin próximo a 265 antes de Cristo, foi batizada de “veneno da água”, pois era associada com mosquitos que mantinham interação com a água (GUBLER, 1998). Já o nome Dengue foi utilizado para descrever as causas da doença que ocorreu nas Índias Ocidentais Espanholas em 1927 vindo da expressão local “ki dengue pepo” em português “ataque de/por maus espíritos” onde a expressão não demonstra o real vetor da doença, apenas a crença da região, mas o nome ficou até os dias de hoje (HOLMES; BARTLEY; GARNETT, 1998).

Existem relatos associados ao dengue desde 1780, e em 1960 fora citado na forma de epidemias. É provável que o vírus da dengue tenha se transformado endemicamente em muitos centros urbanos tropicais durante os períodos interepidêmicos (GUBLER, 1998; MOORE et al., 1993).

Os tratamentos sugeridos envolvem meios para lidar com as citocinas e toxinas envolvidas na infecção, a utilização de inibidores do fator ativador de plaquetas (PAF), pentoxifilina, antioxidantes, n-acetilcisteína, além de inibidores de endorfinas naturais como a naloxona, e de antagonistas da bradicinina, entretanto nenhum teve com eficácia totalmente comprovada.

Análise filogenéticas revelam proximidade entre o DENV e ZIKV (FIGURA 12).

FIGURA 12 RAMO FILOGENÉTICO DO DENV E ZIKV



NOTA: Ramo em negrito representa apenas o destaque dos vírus do presente trabalho.

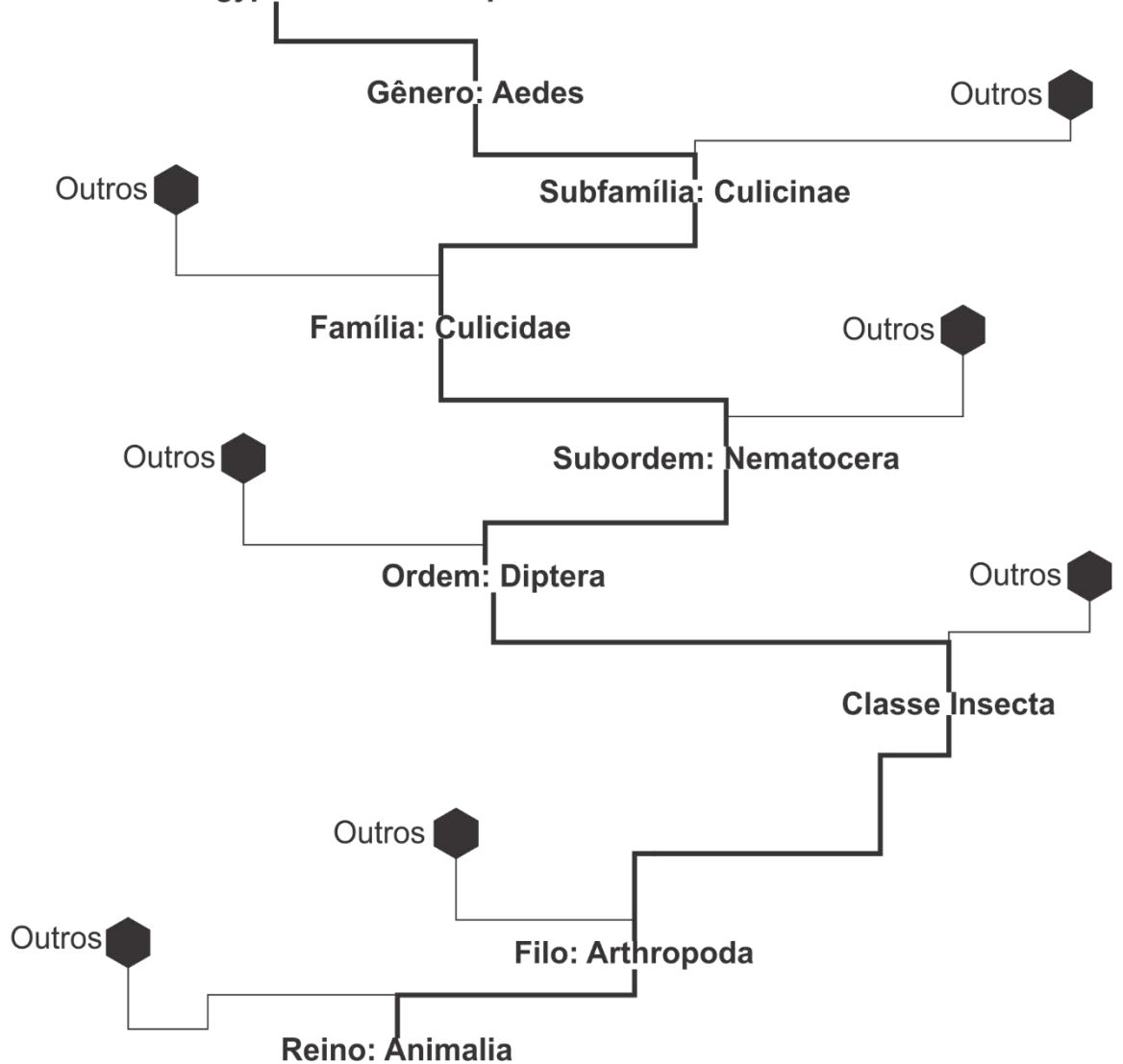
FONTE: O autor (2016) baseado em GATHERER (2016) e TAMURA (2013)

2.3 MOSQUITOS *Aedes*

Os mosquitos são insetos classificados dentro do reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, Subordem Nematocera e família Culicidae, esta família possui mais de 3200 espécies descritas, é subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitina. Na subfamília Culicinae que detem mais de 1200 espécies, temos em destaque o gênero *Aedes* (ALMEIDA, 2011; DA SILVA NETO; WINTER; TERMIGNONI, 2013), (FIGURA 13).

FIGURA 13 ARVORE FILOGENÉTICA ADAPTADA PARA O *AEDES AEGYPTI* E *AEDES ALBOPICTUS*.

Espécie: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* +



NOTA: Ramo em negrito representa apenas o destaque dos vírus do presente trabalho, o sinal + foi utilizando para representar que existem mais espécies *Aedes* no ramo.

FONTE: O autor (2016) com dados de ALMEIDA (2011) e TERMIGNONI (2013).

Uma explicação para os mosquitos *Aedes* serem os principais transmissores é relativa à sua competência vetorial, ou seja, sua capacidade de se abrigar em

ambiente propício para o mesmo se multiplicar. Já em sua anatomia não mantem bloqueio ao vírus, fazendo que o mesmo tenha maior facilidade de transpor os tecidos dos mosquitos (BLACK IV et al., 2002; LI et al., 2012).

Ecossistemas, como do Brasil, oferecem aspectos bem favoráveis para a existência de muitos arbovírus que são mantidos em uma grande variedade de ciclos zoonóticos, dos arbovírus detectados no Brasil que causam doenças humanas nesse estudo são destacados o *Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus)* e *Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse)* (FIGUEIREDO, 2007; FORATTINI, 2002).

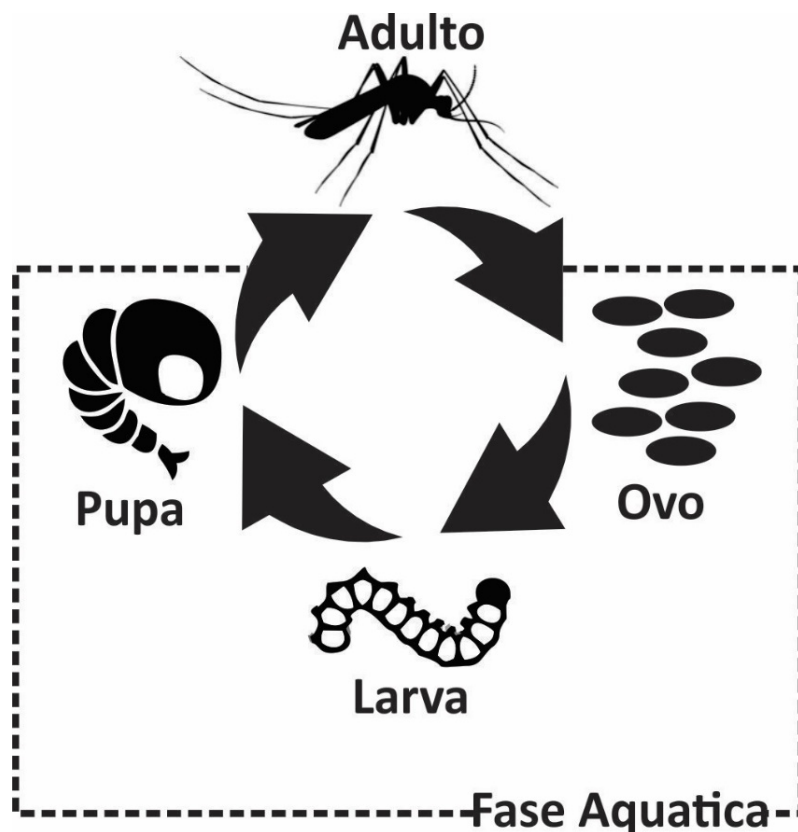
O *Aedes aegypti* (assim também o *albopictus*) são espécies que habitam em climas tropicais e subtropicais. Essas faixas compreendem entre as latitudes 35°N e 35°S, com relatos de mosquitos encontrados fora dessa faixa, quase sempre em virtude a estação quente, pois o mesmo não sobrevive a invernos rigorosos, e não é encontrado com facilidade acima dos 1000 metros do nível do mar, porém há registros de presença do mosquitos em locais com 2200 metros acima do mar (BRASIL, 2001).

A oviposição se faz nas paredes dos criadouros pouco acima da superfície da água. Os ovos não chegam a 1mm de comprimento. Para um bom desenvolvimento os embriões demoram cerca de 48 horas em boas condições de umidade e temperatura, assim os ovos se tornam resistentes a dessecação e podem sobreviver por até 450 dias sem o contato com a água (BRASIL, 2001; GADELHA; TODA, 1985).

Na fase de larva, ocorre a absorção de material orgânico acumulado aos redores do criadouro para elevar seu tamanho. O crescimento é dependente da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Em condições favoráveis a fase de larva dura 5 dias, já em condições adversas pode durar semanas. Nessa fase a larva já responde a estímulos de movimentos na água e a feixes de luz, utilizando manobras evasivas (BRASIL, 2001; RAI, 1991).

Na fase de pupa, é onde ocorre a transformação de larva para mosquito adulto, nessa fase as pupas não se alimentam e a movimentação é limitada, essa fase dura entre 2 a 3 dias (BRASIL, 2001; EISEN et al., 2009; WHO, 2012), Na sequência, ocorre o aparecimento de características próprias dos mosquitos adultos como asas, probóscito e patas (GADELHA; TODA, 1985), (FIGURA 14).

FIGURA 14 CICLO REPRODUTIVO DOS MOSQUITOS AEDES

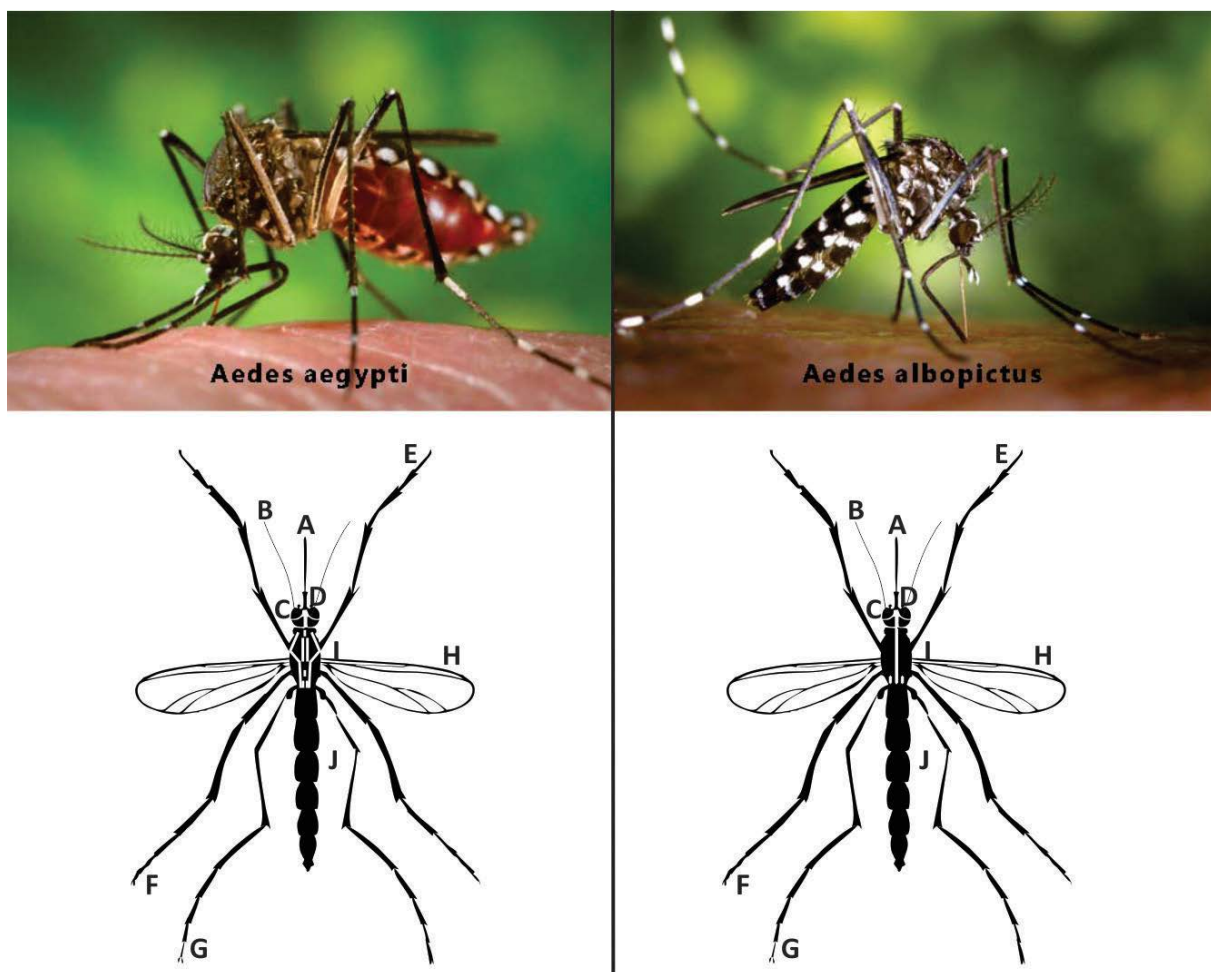


FONTE: O autor (2016) baseado em COSTA (2002) e GADELHA (1985).

O *Aedes aegypti* também conhecido como “mosquito da dengue”, apresenta como características fenotípicas corpo escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos, apresenta desenho semelhante a uma lira no dorso (BESERRA et al., 2006; GADELHA; TODA, 1985), é um mosquito de hábitos diurnos, seu controle é árduo, pois o mosquito é muito versátil na escolha dos criadouros quase predominantemente domésticos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

O *Aedes albopictus* também conhecido como “tigre asiático” apresenta como características fenotípicas a coloração negra; com uma faixa estreita, longitudinal, mediana, possuem hábitos antropofílicos e zoofílicos diurnos e fora dos domicílios humanos (GRATZ, 2004; HAWLEY, 1988). A olho nu são de difícil diferenciação, porém a morfologia das espécies são similares e podem ser visualizadas como na figura 15.

FIGURA 15 REPRESENTAÇÃO MORFOLÓGICA APROXIMADA DE MOSQUITOS *AEDES AEGYPTI* E *AEDES ALBOPICTUS*.



LEGENDA: A (Proboscido), B (Antena), C (Olho), D (Palpo), E (Pata Anterior), F (Pata Média), G (Pata Posterior), H (Assa), I (Tórax) e J (Abdômen).

NOTA: O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Pode ser diferenciado a presença de uma listra no torax do *Aedes albopictus* e um formato de lira no *Aedes aegypti*.

FONTE: O autor (2016) baseado em BRASIL (2001) e BENCHIMOL (2006).

O mosquito tem expectativa de vida de meses se mantidos em laboratório, mas na natureza, vivem em média 33 dias. Metade dos mosquitos morre durante a primeira semana de vida, do restante 95% durante o primeiro mês (BENCHIMOL; SÁ, 2006; BRASIL, 2002; WHO, 2012).

Somente o mosquito fêmea é hematófago (admite-se que a hematofagia atinja seu pico em dois horários um matutino (6h às 8h) e outro vespertino (16h às 18h) , já os machos se alimentam de seiva de plantas. As fêmeas depositam seus ovos em receptáculos com água limpa e parada, de preferência na sombra e próximos a residências humanas. Esses mosquitos demonstram uma adaptação ao meio urbano impressionante, onde criadouros artificiais são preferidos a criadouros naturais. O uso do sangue é essencial para o completo desenvolvimento dos ovos (FORATTINI, 2002; MOREIRA et al., 2009; SILVA; ANGERAMI, 2008; WEAVER; LECUIT, 2015).

O número de ovos depositados por cada fêmea é relativamente ligado a quantidade de sangue ingerido, em média de 3,0 a 3,5 mg, o que corresponde aproximadamente a 120 ovos. Mas sua postura é feita parceladamente em ocasiões sucessivas, em um ciclo de oviposição a fêmea poderá visitar ao menos 200 habitações. Esse tipo de comportamento é chamado de “oviposição em saltos”. Embora o mosquito tenha o aparato fisiológico para percorrer grandes distâncias, ele não tenderá a sair do raio de 800 metros de onde iniciou suas atividades, salvo se seu deslocamento for por intermédio de transportes passivos (CORBET; CHADEE, 1993 ;ALLAN; KLINE, 1998; FORATTINI, 2002). Já foi evidenciado que uma fêmea pode voar até 3Km em busca de local adequado para a oposição, quando não há criadouros apropriados nas proximidades (BRASIL, 2001).

Mosquitos *Aedes*, implantaram-se com facilidade em quase todo o Brasil. Uma vez infectado, o artrópode permanecerá infectado pelo vírus por toda sua vida (CASSEB et al., 2013). A propagação dos mosquitos *Aedes aegypti* no Brasil são oriundos provavelmente do período colonial, na época do tráfico de escravos, onde navios que aportavam em portos brasileiros, desencadeavam inúmeras epidemias (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994), Utilizando o mesmo mecanismo ou acrescido pelo uso de aviões, o *Aedes albopictus* espalhou-se do Sudeste Asiático para todo o mundo tropical, foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1987 em regiões próximas do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR, 2001; TSETSKARKIN et al., 2014).

O risco do aparecimento de novos arbovírus no Brasil está associado com o surgimento das grandes cidades densamente povoadas, que tem contato com os

mosquitos, dando condições favoráveis para sua reprodução. Humanos ou animais podem ser infectados a partir de contextos epidemiológicos ecológicos onde ocorrem zoonoses por arbovírus (FIGUEIREDO, 2007; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; MOURAO et al., 2015; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1989).

Existe a possibilidade de cópula interespecífica, o que pode gerar uma competitividade. É observada uma maior capacidade de machos de *Aedes albopictus* de copular com fêmeas de *Aedes aegypti* de aproximadamente 90%, já ao inverter as posições a proporção chega aproximadamente em 5%. Entretanto, as taxas de fertilidade são mais altas quando um macho de *Aedes aegypti* copula com uma fêmea de *Aedes albopictus*. Essa transmissão (venérea) ocorre apenas de macho para fêmea (FORATTINI, 2002; NASCI; HARE; WILLIS, 1989; ROSEN, 1987).

O controle de mosquitos *Aedes* é de grande importância, entanto não foi muito bem-sucedido em muitas partes do país. Sua fácil adaptabilidade a meios urbanos, como também a sua variedade de vírus que pode carregar tornam um risco para saúde pública brasileira (FIGUEIREDO, 2007; MOURAO et al., 2015).

As medidas de controle concentram-se em eliminar os focos ou berçários do mosquito, reduzir ou tratar a água parada em recipientes onde os ovos são depositados (e posteriormente as larvas se desenvolvem), medidas como eliminar populações do mosquito através de técnicas tradicionais como aplicações de larvicidas e inseticidas tem sucesso limitado no controle dos mosquitos, pois o mecanismo de aplicação não são projetadas para penetrar no interior das residências, onde uma boa parte dos mosquitos descansa e se alimenta (EISEN et al., 2009; WEAVER; LECUIT, 2015).

Até que haja um tratamento ou vacina contra as principais arboviroses, o controle das patologias geradas pelos mesmos vai contar com a redução do vetor e sobre a limitação o contato entre os seres humanos e os mosquitos *Aedes*. Atividades antivetoriais importante para barrar o avanço dos mosquito tem que ser estimuladas: por meio de vigilância ambiental e de saúde em reservatórios potenciais ou atuais de larvas de mosquito e aplicação de inseticida em locais com transmissão ativa das doenças; um terceiro componente é relativo à informação, educação e comunicação sobre a doença e seus meios de prevenção (EISEN et al., 2009; TAUIL, 2001).

A plasticidade e adaptabilidade de transmissão viral do DENV e ZIKV pelo *Aedes aegypti* e pelo *Aedes albopictus* impõe grande preocupação para a saúde pública.

2.4 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA DENV E ZIKV

Com novas possibilidades de deslocamento tanto para viagens como para comercio a nível mundial em velocidade e frequência mais rápidas com o uso do transporte aéreo, é exercido um fator que viabiliza o deslocamento de vetores para áreas onde o mesmo não era conhecido, bem como o contato direto do homem com áreas inexploradas, onde existe a possibilidade de haver agentes até então desconhecidos. No mesmo fluxo podemos citar a importação e exportação de animais como uma forma de trazer novos agentes a diversicar áreas, ou até mesmo reintroduzir vetores em regiões controladas (LUNA, 2002; SCHATZMAYR, 2001).

Um exemplo clássico da disseminação de mosquitos *Aedes* vem da comercialização de pneus usados, onde ovos do mosquitos são transportados juntos aos pneus e difundidos por todo mundo, ocasionando novos foco do mosquito e causando a emergência e reemergência de doenças (MORSE, 1995) a figura 16 mostra os casos reportados de dengue e zika no ano de 2015.

sorotipos ativos são detectados apenas quando o arsenal viral já está instalado, dias após a infecção (BRASIL, 2007; GOMES, 2002).

É reconhecido em escala global, uma visível decadência dos sistemas de saúde, fruto da elevada demanda e dos custos crescentes da assistência médica, que vem a absorver grande parte dos recursos antes destinados às áreas de prevenção e controle de agravos. A prevenção se feita da forma correta pode diminuir o custo da assistência médica (SCHATZMAYR, 2001).

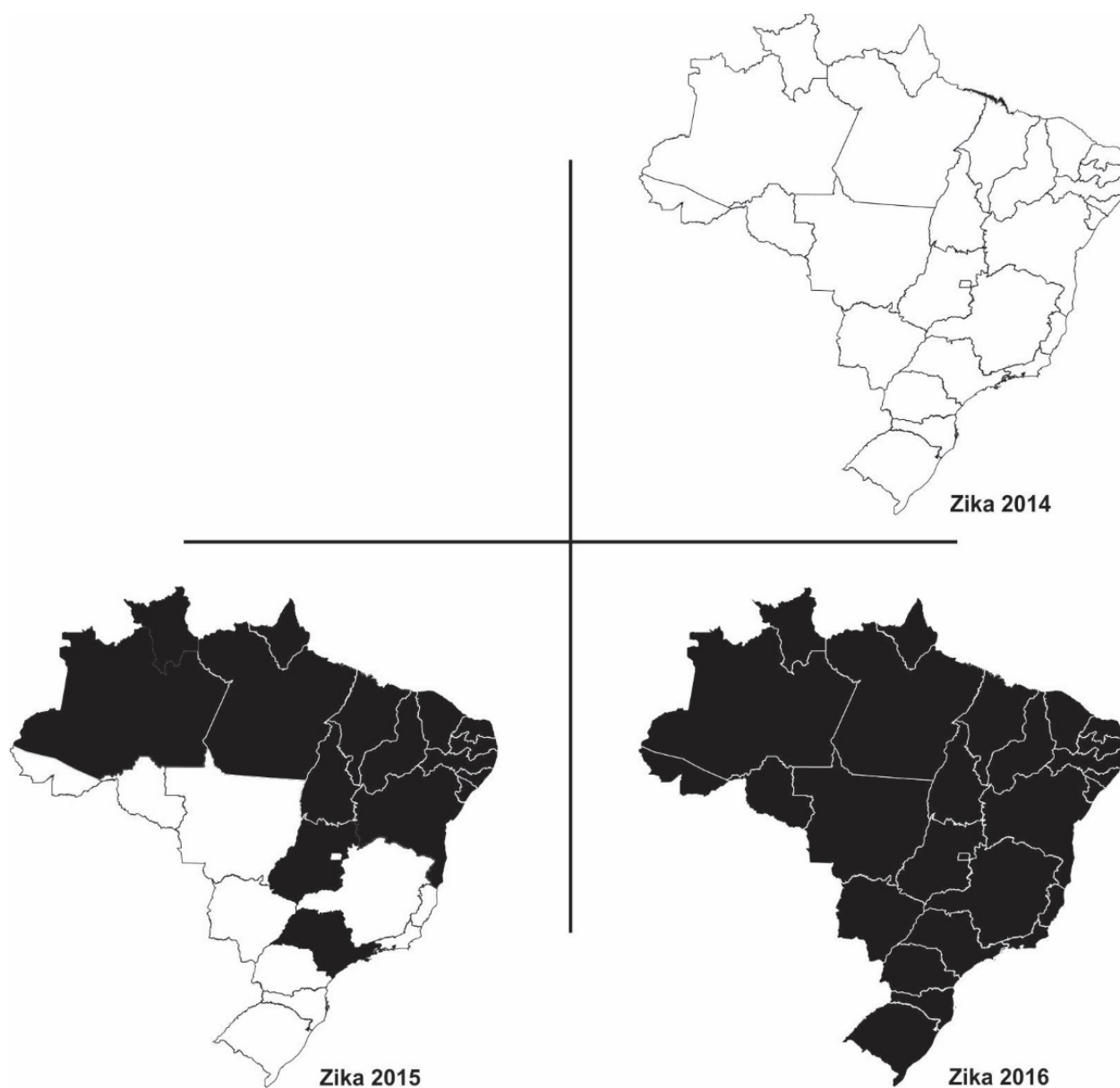
2.4.1 DISTRIBUIÇÃO DA DENV E ZIKV NO BRASIL

No Brasil, as modificações, a longo prazo, dos padrões de morbidade, invalidez e morte que caracterizam uma população específica e que, em geral, ocorrem em conjunto com outras transformações demográficas, sociais e econômicas nunca foi aplicável com perfeição, isso pode ser constatado pelas marcantes desigualdades regionais e sociais, com a existência de aglomerados populacionais nos quais os perfis de mortalidade pouco se alteraram nas últimas décadas (LUNA, 2002)

A dengue já faz parte das arboviroses instaladas no Brasil há décadas. Entretanto o zika é bem mais recente com o surgimento dos primeiros casos da doença no Brasil no início de 2015 (ZANLUCA et al., 2015).

Nas Figuras 17 e 18 é possível observar que em 2016 tanto a circulação de e ZIKV é DENV reportado em todos os estados do Brasil.

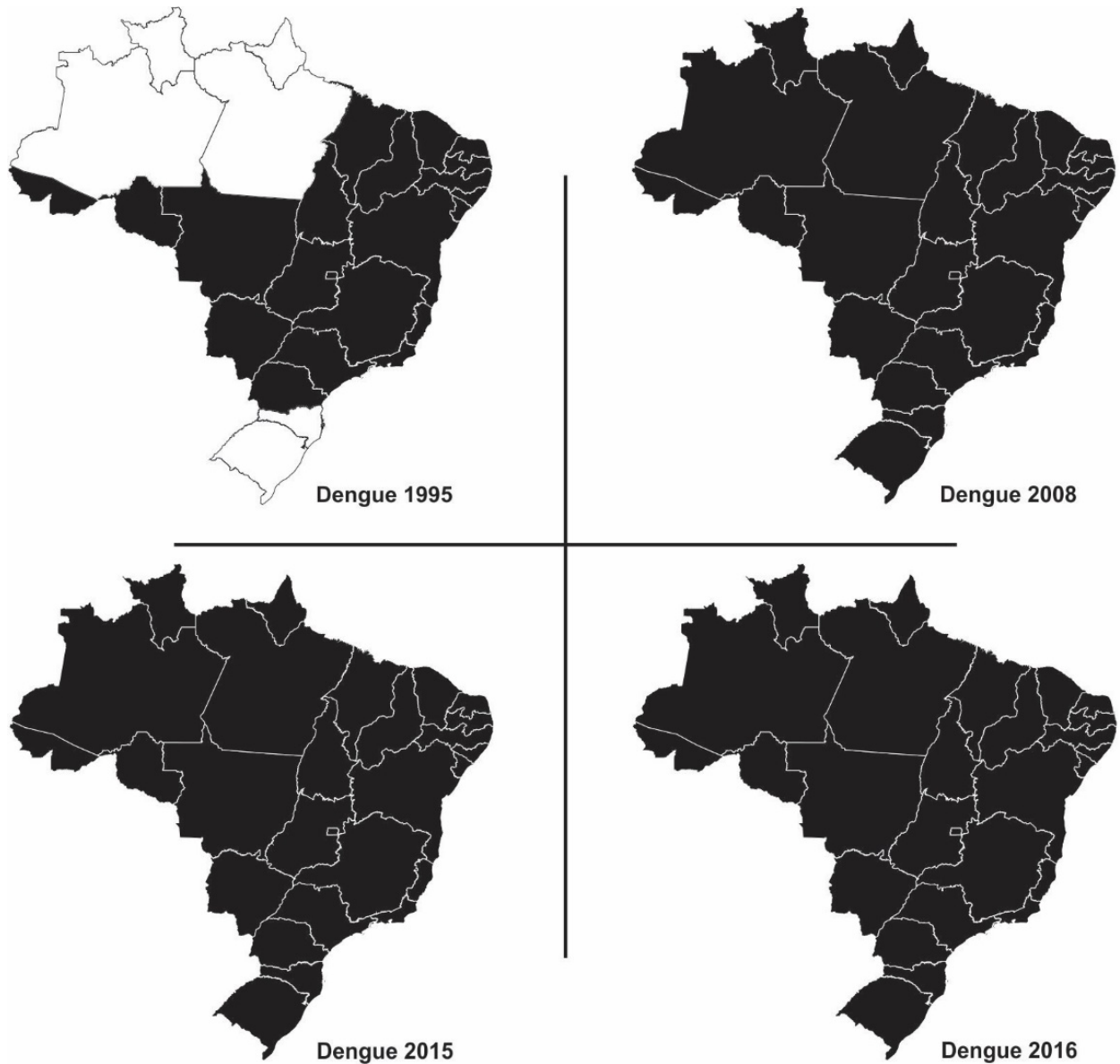
FIGURA 17 CASOS REPORTADOS DE ZIKA NO BRASIL EM 2014 ,2015 E 2016
(ATÉ 01/05/2016)



NOTA: Os estados com preenchimento são os com alertas confirmados.

FONTE: O autor (2016) com dados de CDC (2016) e HeartMap.org (2016)

FIGURA 18 CASOS REPORTADOS DE DENGUE NO BRASIL EM 1995, 2008, 2015 E 2016
(ATÉ 01/05/2016).



NOTA: Os estados com preenchimento são os com alertas confirmados.

FONTE: O autor (2016) com dados de CDC (2016) e HeartMap.org (2016)

Existe uma grande dificuldade de implantar um programa de controle do vetor efetivo nas grandes comunidades urbanas, pois há uma rápida dispersão do vírus e

uma explosão da epidemia em vários estados (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986).

2.5 COMBATE AO VETOR

Os principais métodos para a prevenção da doença dependem do controle do mosquito vetor, principalmente nas residências onde detém a maioria das transmissões por um comportamento sinantrópico, para uma efetiva prevenção ações como eliminação dos locais de reprodução do mosquito, melhoria no manejo dos resíduos sólidos, organização do ambiente urbano, maiores investimentos e efetividade nos programas de educação da rede pública, principalmente conscientizando que o controle envolve todas as esferas da sociedade, uma das medidas preventivas como a eliminação de criadouros artificiais pode ser realizado por qualquer pessoa, e se demonstra eficaz se adotado por toda população (COSTA et al., 2002; PANAM, 1998; RAI, 1991).

O principal agente público que atua diretamente no combate ao vetor são os ACEs (Agente de Controle de Endemias) que executam funções como: descobrir focos, destruir e evitar a formação de criadouros, impedir a reprodução de focos, fazer a instalação de armadilhas, aplicação de larvacidas/inseticidas, realizar procedimentos mecânicos de bloqueio do vetor, colher dados epidemiológicos e orientar a comunidade com ações educativas (BRASIL, 2001, 2009).

A constatação da circulação do vírus é necessária para a ação de um bloqueio nas localidades no intuito de cessar a transmissão do vírus. Após investigação epidemiológica conclusiva sobre o vírus circulante, as ações de bloqueio consistem em aplicação de inseticida em UBV (Tratamento ultra baixo volume), sempre em conjunto com medidas de controle larvário e/ou nebulização domiciliar nas áreas de transmissão focais delimitadas, o bloqueio deve atingir 100% dos imóveis num raio de 300 metros a partir do ponto de detecção positiva (BRASIL, 2001, 2011b), é importante ressaltar que as equipes de combate ao vetor efetuem o bloqueio baseado na localização da moradia que a pessoa informou ao sistema de saúde.

Novas estratégias para o controle de vetores incluem a liberação de mosquitos transgênicos projetados para não terem poder de reprodução, também o uso de

bactérias , que em contato com os mosquitos pode reduzir sua competência vetorial (MOREIRA et al., 2009). No mercado é comum encontrar vários produtos como repelentes de uso em pessoas e de ambientes, bem como inseticidas que prometem eliminar os “ mosquitos causadores de doenças”.

É amplamente reconhecido que a vacinação passiva é uma opção terapêutica preventiva e apropriado para muitas infecções virais em seres humanos, incluindo a propagação por transmissão vertical viral, especialmente quando não está disponível uma terapêutica alternativa (DESSAIN; ADEKAR; BERRY, 2008).

Buscar conhecimento para o controle da competência vetorial, unido a fatores que interferem na capacidade vetorial das populações de insetos poderão levar ao desenvolvimento de novas tecnologias para o controle das doenças transmitidas por vetores (GUEDES; AYRES, 2012)

2.6 DIAGNÓSTICO CLÍNICO PADRÃO

O diagnóstico de ZIKV e DENV é tipicamente clínico, porque a associação de febre aguda e artralgia é altamente preditiva em áreas onde a doença é endêmica e onde as epidemias já ocorreram. No entanto, cada um dos vírus pode gerar sintomas diferenciados ao decorrer do tempo (BARTH, 2000; STAIKOWSKY et al., 2009)

A artralgia crônica pode conduzir a incapacidade persistente com necessidade de tratamento a longo prazo com anti-inflamatórios não esteróides e medicamentos imunossupressores, tais como o metotrexato, embora a sua segurança e eficácia ainda não foi demonstrada em ensaios clínicos. (GANU; GANU, 2011)

O principal achado laboratorial para dengue é linfocitopenia, quantidade anormalmente baixa de linfócitos (menos de 1500 células por microlitro de sangue no adulto ou menos de 3000 células por microlitro na criança) está estreitamente associado com viremia, outras alterações laboratoriais incluem a diminuição das plaquetas que participam na coagulação, aumento dos níveis de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase no sangue, taxa de cálcio no sangue abaixo da considerada normal (LONGO et al., 2013; WEAVER; LECUIT, 2015). Para Zika os achados laboratoriais não são bem descritos (BALM et al., 2012), (TABELA 2).

TABELA 2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PESSOAS COM DENGUE OU ZIKA

Manifestação clínica/ Laboratorial	Dengue vírus	Zika vírus
Febre (intensidade)	+++	+
Mialgia	+++	+
Exantema	+	+++
Artralgia	+/-	+
Cefaléia	+++	+
Conjuntivite	-	+++
Discrasia	++	-
Choque	+++	-
Plaquetopenia	+++	+/-

NOTA: Comparação da frequência de sintomas entre pacientes com dengue e zika; +++ = 70-100% dos pacientes; ++ = 40-69%; + = 10-39%; +/- = 0

FONTE: O autor (2016) adaptado de BRASIL (2015) e JUNIOR (2015)

2.6.1 DIAGNÓSTICO POR MEIO DA BIOLOGIA MOLECULAR

Um diagnóstico definitivo baseia-se na detecção de vírus através de reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT - PCR) durante a fase de viremia, o RT - PCR pode ser concebido num formato multiplex para detectar simultaneamente várias outros arbovírus, tais como o ZIKV e DENV, que pode ser extremamente útil para a triagem de pacientes. Também existe a possibilidade de cultura dos vírus numa variedade de células para uma posterior caracterização virológica, mas não apresente valor significativo na prática clínica e não é realizado rotineiramente. Já o sorodiagnóstico é facilitado pela diversidade antigênica limitada dos vírus e suas extensas reatividades cruzada dos anticorpos induzidos por tensões diferentes. O IgM é detectável a partir do sétimo dia e até vários meses após o início da doença, e é considerado diagnóstico. A soroconversão também pode ser detectada como um aumento no IgG (CECÍLIO et al., 2015; RUST, 2012; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; WEAVER; LECUIT, 2015).

Conforme a ciência conhece melhor a intimidade do processo de replicação viral, é demonstrada a importância para determinar o processo de emergência e reemergência de viroses (SILVA; ANGERAMI, 2008).

O contexto epidemiológico dos vírus é repeditamente alterado, visto a grande facilidade de transmissão da maioria de seus agentes, o processo de globalização e a elevada taxa de mutação de muitos deles, possivelmente a situação descrita aqui se modifique significativamente em pouco tempo, a constante evolução tecnologia diagnóstica também permitirá a identificação de novos vírus. A incorporação das técnicas de biologia molecular à investigação das doenças transmissíveis vem permitindo um grande avanço nos conhecimentos e possibilitando a abertura de toda uma nova abordagem, a da identificação de microrganismos como co-fatores em várias doenças crônicas, tudo isso permite uma verdadeira explosão do conhecimento a respeito dos vírus (CANN, 2005; LUNA, 2002; SILVA; ANGERAMI, 2008).

Para que seja viável a detecção de arbovírus é imprescindível uma rede de laboratorial organizada de forma sólida, com complexidade crescente, com equipamento adequado, suprimento oportuno de insumos, profissionais capacitados e capazes de garantir as condições necessárias de biossegurança, juntamente reforço da rede de serviços de vigilância epidemiológica é outra peça fundamental para garantia das condições de enfrentamento das doenças emergentes e reemergentes. (LUNA, 2002).

2.7 GEORREFERENCIAMENTO NA SAÚDE

Georreferenciar significa ter o poder de associar algo com locais no espaço físico. Este é muito utilizado no campo de sistemas de informação geográfica para descrever o processo de associar um mapa físico ou imagem raster de um mapa com locais espaciais. A georreferenciação pode ser aplicada a qualquer tipo de objeto ou estrutura que possa estar relacionada a uma localização geográfica, como pontos de interesse, estradas, lugares, pontes ou edifícios (HACKELOEER et al., 2014).

O georreferenciamento busca o auxílio na vigilância epidemiológica e tem como objetivos: evitar a introdução da doença em áreas livres, detectar precocemente a transmissão, reduzir os casos graves e, com isso, reduzir o número de óbitos e detectar os sorotipos circulantes (SÃO PAULO, 2014).

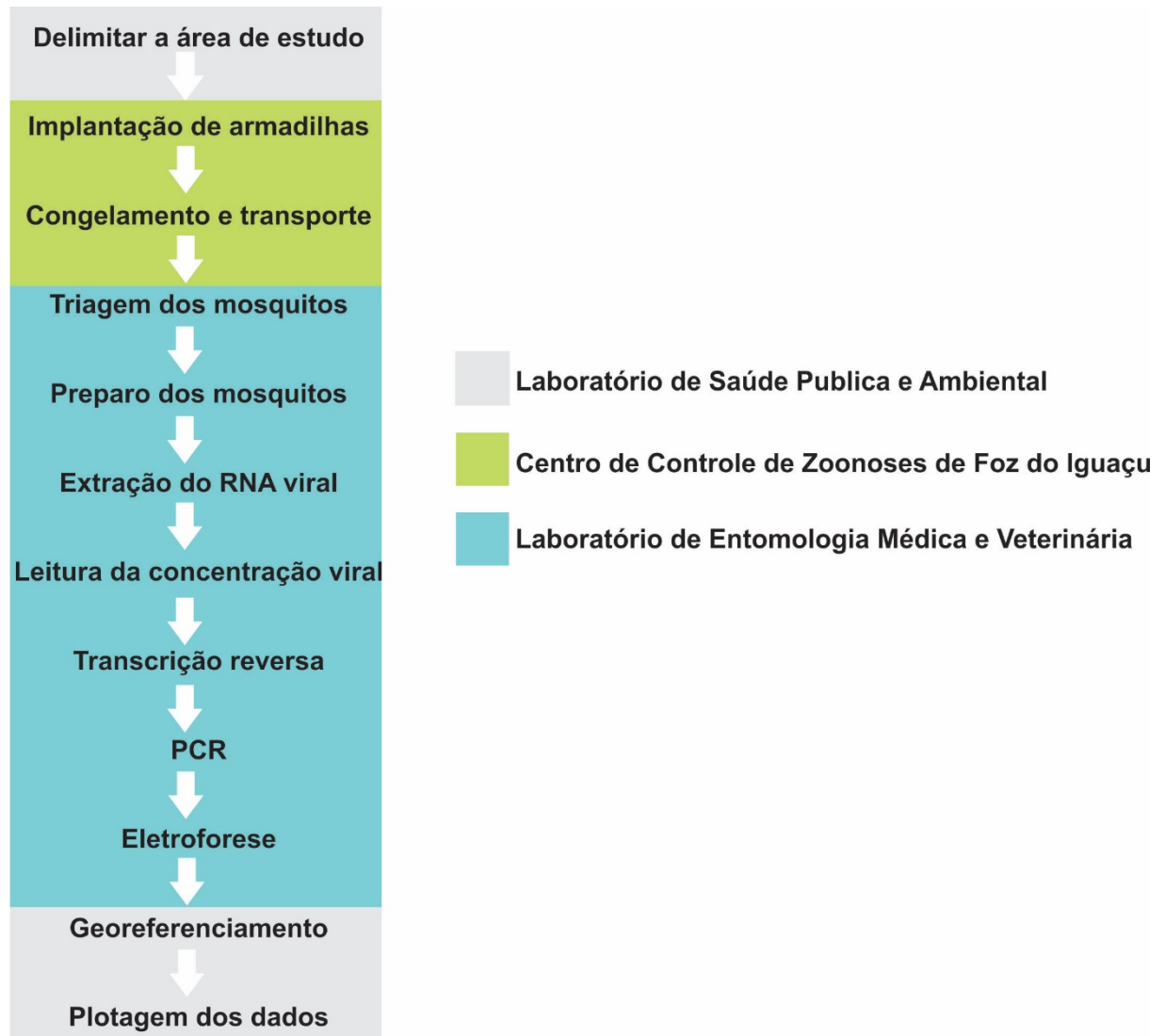
O município pode ser classificado em estratos para um efeito operacional, ele é baseado em enfoque de risco com base em dados entomo-epidemiológicos, os estratos são classificados em: Estrato I área com transmissão de Dengue Clássico por 2 anos ou mais; Estrato II área com transmissão de dengue clássico; Estrato III área infestadas pelo *Aedes aegypti* e Estrato IV área sem o vetor (BRASIL, 2001).

É importante salientar que a admissão dos estratos foi realizada no ano de 2001 quando não se havia notícias de Zika em território brasileiro, mas que a política de prevenção e combate à Dengue também é aplicada à Zika.

3 MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

FIGURA 19 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO PROJETO

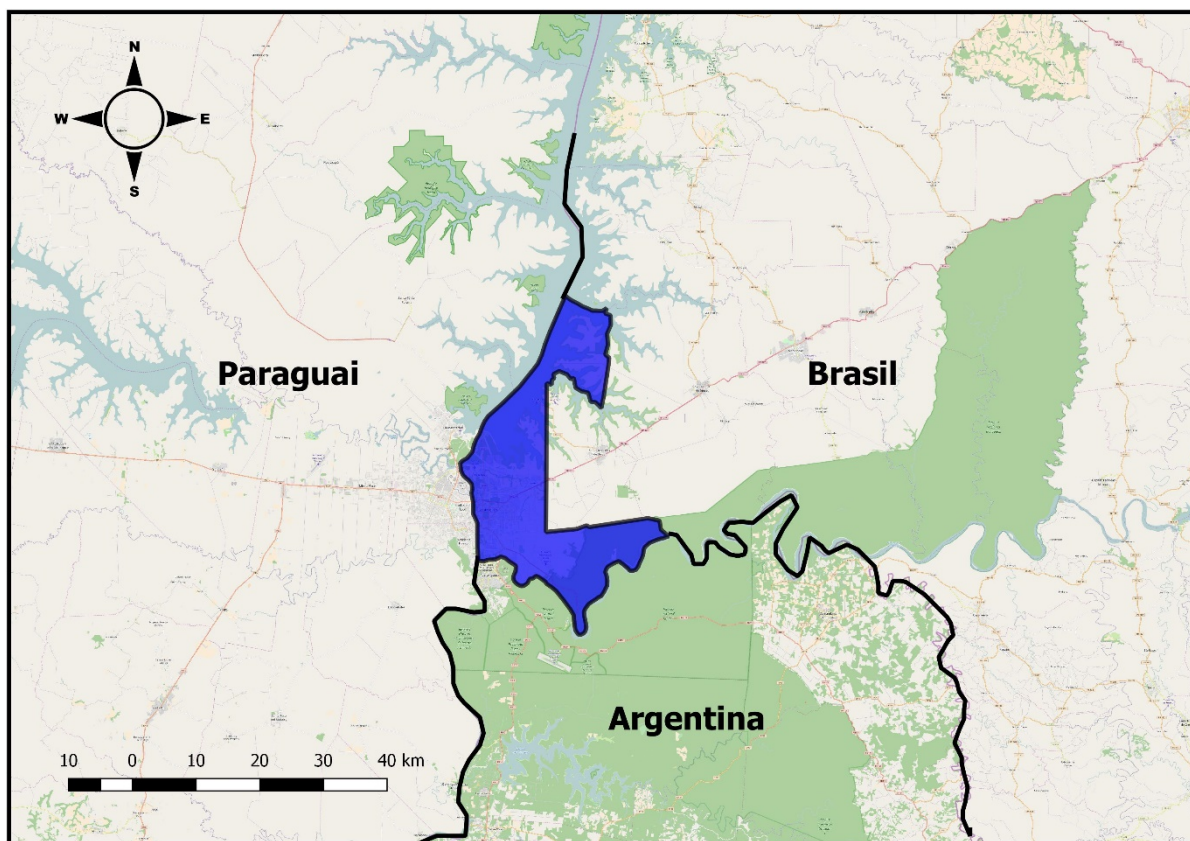


Fonte: O autor (2016)

3.2 LOCAIS DE ESTUDO

O local de estudo onde foram implantadas as armadilhas e coletas de mosquitos foi no município de Foz do Iguaçu, onde já detinham armadilhas instaladas. Situado no extremo oeste do estado do Paraná numa região de tríplice fronteira, limitofronteiras com Ciudad del Este, Presidente Franco e Hernandarias no Paraguai e Puerto Iguazú na Argentina (PARANÁ, 2006), (FIGURA 20).

FIGURA 20 CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU E SUAS FRONTEIRAS ENTRE OS PAÍSES ARGENTINA, BRASIL E PARAGUAI

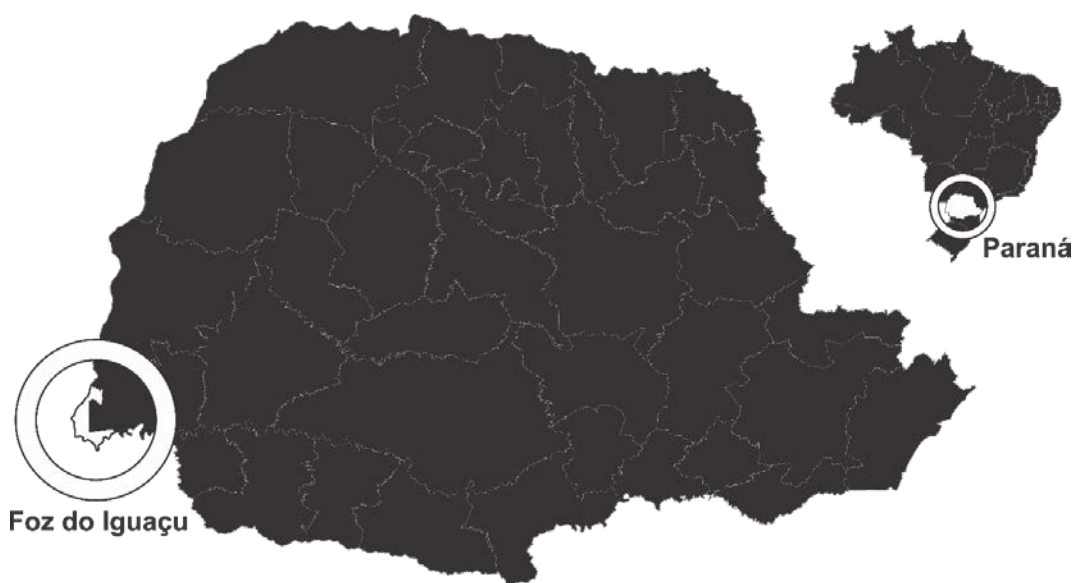


NOTA: Foz do Iguaçu em destaque azul

FONTE: O autor (2016) via software QGIS e Compositor

Localizada geograficamente pelas coordenadas ($-25^{\circ} 32' 52''$ S e $54^{\circ} 35' 17''$ W) é conhecida por manter inter-relações socioculturais e tem um fluxo intenso de bens e pessoas (BRASIL, 2011a; PARANÁ, 2006) a cidade tem 263.782 habitantes segundo censo de 2015, mas o número de pessoas em trânsito é maior, pois a cidade é muito visitada tanto para comércio, quanto por suas belezas naturais. No ano de 2015 Foz do Iguaçu ultrapassou os 2 milhões de visitantes (PARANÁ, 2016).

FIGURA 21 REPRESENTAÇÃO GEOGRÁFICA DA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU EM RELAÇÃO AO BRASIL E AO ESTADO DO PARANÁ



FONTE: O autor (2016) via software CorelDraw

FIGURA 22 CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU VISUALIZADA VIA SATÉLITE



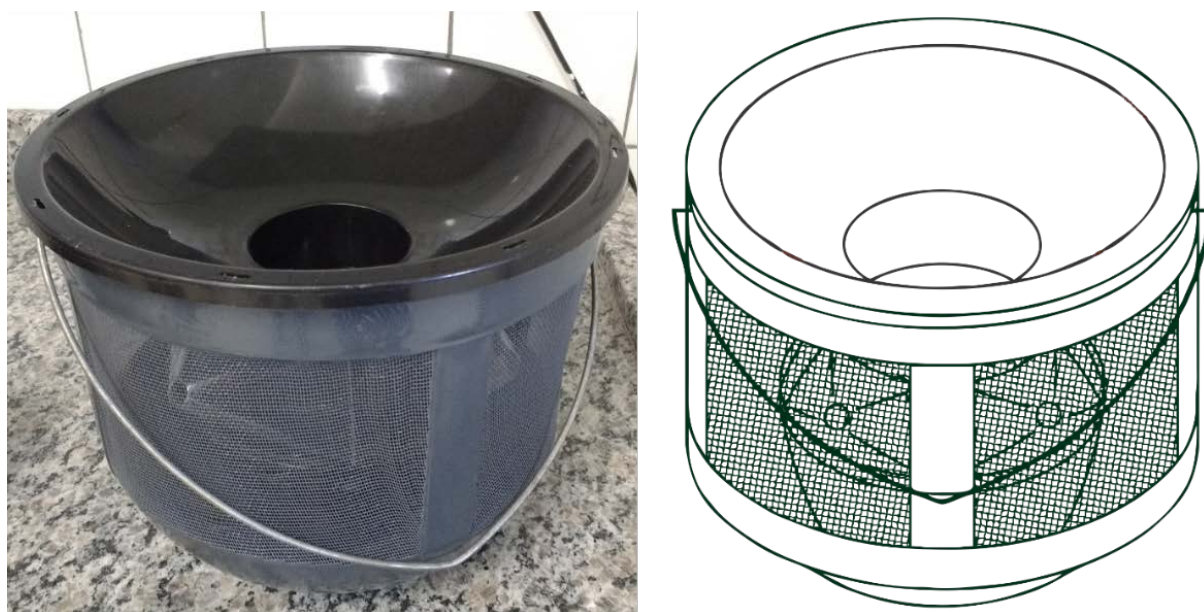
FONTE: O autor (2016) via software QGIS e Compositor

3.3 COLETA

Foram realizadas as coletas dos mosquitos em parceria com o Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ) e Secretária de Saúde do Estado do Paraná em locais da região central no período de Janeiro a Abril de 2016.

Para a coleta foram utilizadas as armadilhas Adultrap® que consistem em uma estrutura em forma cilíndrica, cor escura, formando três compartimentos, sendo um para isca (agua de torneira), um para entrada do adulto e outro para retê-lo dentro da armadilha telada (DONATTI; GOMES, 2007), (FIGURA 23).

FIGURA 23 IMAGEM REAL AO LADO DO ESQUEMA ESTRUTURAL DA ARMADILHA ADULTRAP®



FONTE: O autor (2016) com imagem estrutural baseada no fabricante.

A armadilha indicou ser mais efetiva que o uso de aspiração, bem como ter maior especificidade de capturas de mosquitos fêmea, também evidenciou-se a sensibilidade da armadilha para detectar *Aedes aegypti* em situação de baixa frequência (GOMES et al., 2007).

A adultrap® mostrou-se útil para revelar situações propícias à transmissão

da dengue, bem como de fácil operacionalidade, em relação a outros métodos (GOMES et al., 2008), outros fatores que se destacam na aplicabilidade das armadilhas são a utilização de água como atraente do mosquito, mas o mosquito não consegue efetuar a oviposição, captura o mosquito fêmea na fase adulta e alguns casos até com repasto recente, instalação e retirada facilitada, possibilidade de obter os mosquitos íntegros para a análise mas sem oferecer risco a população.

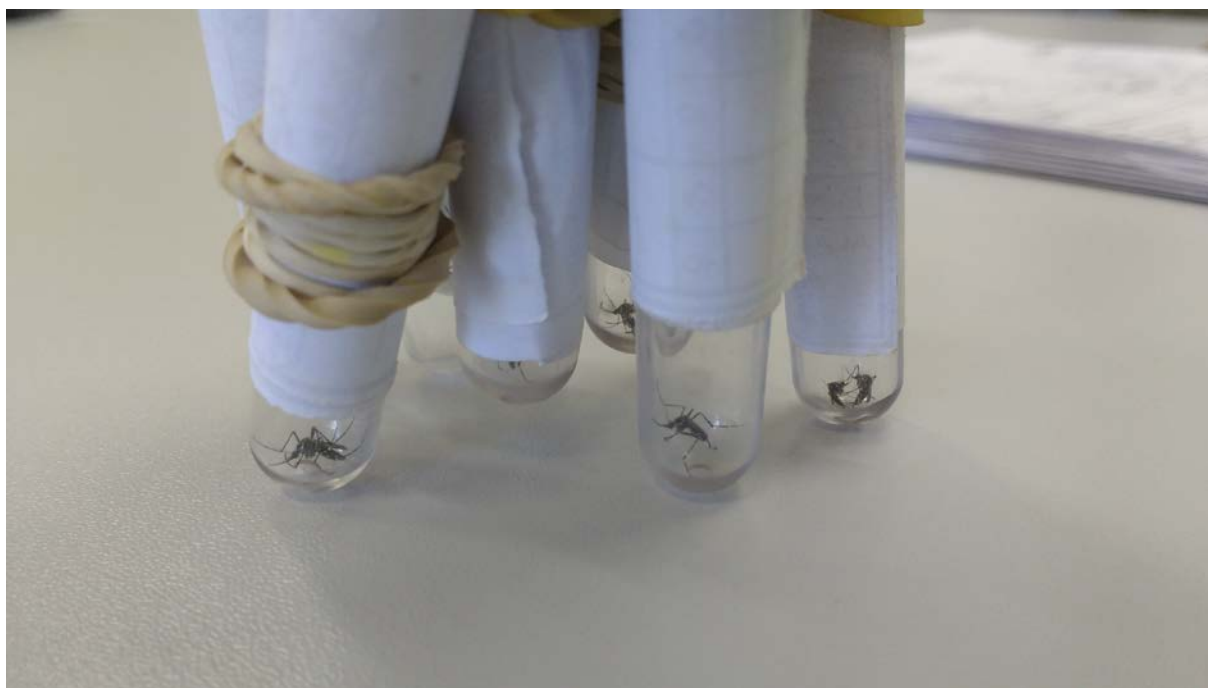
Após a captura, os mosquitos são armazenados em tubos de ensaio (FIGURA 24) identificados (FIGURA 25) e posteriormente armazenados em câmaras de nitrogênio líquido, a armadilha é limpa, trocada a água e retorna ao local de captura.

FIGURA 24 MOSQUITOS COLETADOS NA CIDADE DE FOZ DO IGUAÇU ARMAZENADOS EM TUBOS DE ENSAIO



FONTE: O autor (2016)

FIGURA 25 GRUPO DE MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU E IDENTIFICADOS POR EXTRATOS



FONTE: O autor (2016)

Após realizada a coleta, os mosquitos foram encaminhados ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná para a detecção viral.

3.4 PREPARO DOS MOSQUITOS

Os espécimes foram dispostos com ajuda de pinça de ponta fina, tomando o cuidado para evitar danificação do material coletado, o que poderia comprometer a classificação no laboratório, onde os adultos foram triados e separados por espécie, sexo, localidade e data da coleta.

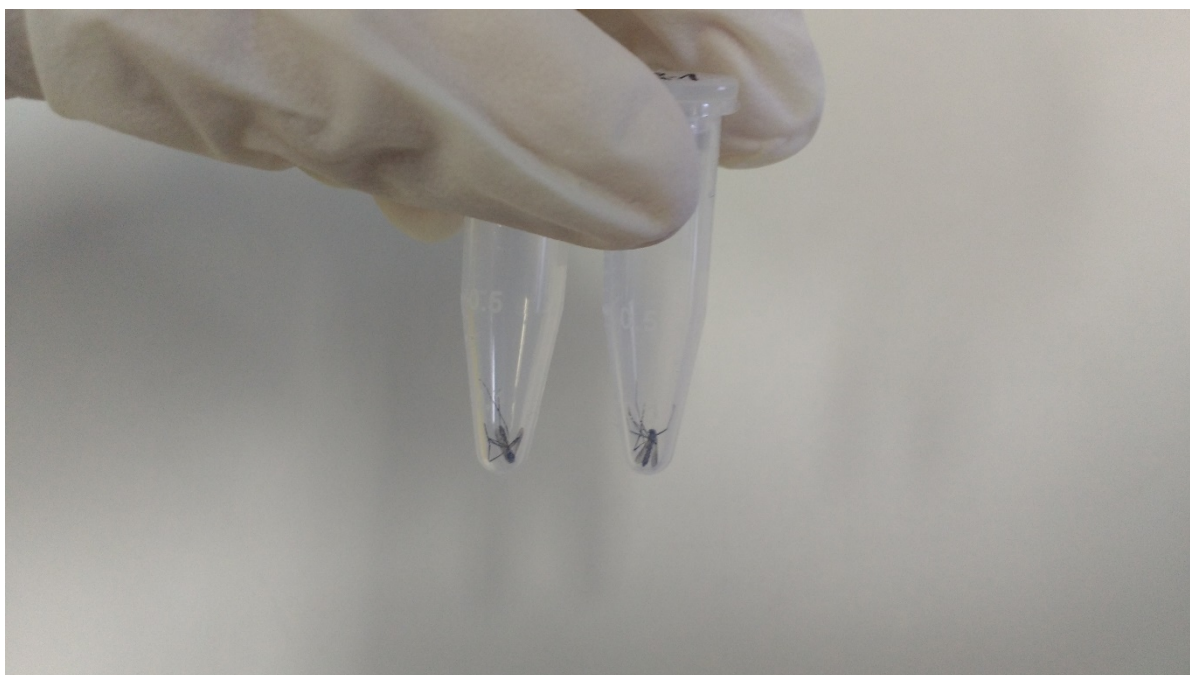
Foram formados os pools de 1 a 12 mosquitos (FIGURA 26), dos 143 triados (FIGURA 27), de acordo estes critérios (TABELA 3).

TABELA 3 IDENTIFICAÇÃO DO POOL DE MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU E A QUANTIDADE DE MOSQUITOS UTILIZADOS NO POOL

Nº Pool	Quantidade de mosquitos	Nº Pool	Quantidade de mosquitos
1	11	12	13
2	9	13	6
3	9	14	2
4	8	15	3
5	10	16	2
6	11	17	2
7	8	18	5
8	9	19	1
9	8	20	1
10	12	21	1
11	12		

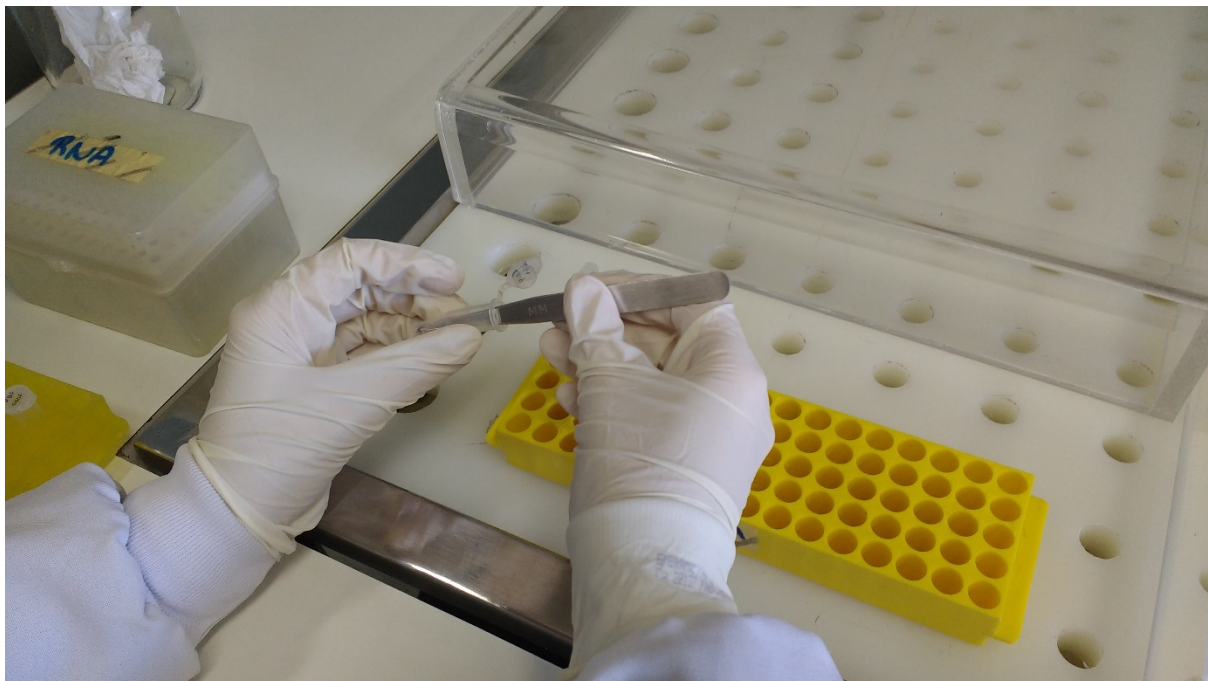
FONTE: O autor (2016)

FIGURA 26 MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU DEPOSITADOS EM MICROTUBOS PARA MACERAÇÃO E FORMAR OS POOLS



FONTE: O autor (2016)

FIGURA 27 TRIAGEM DOS MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU EM MESA REFRIGERADA

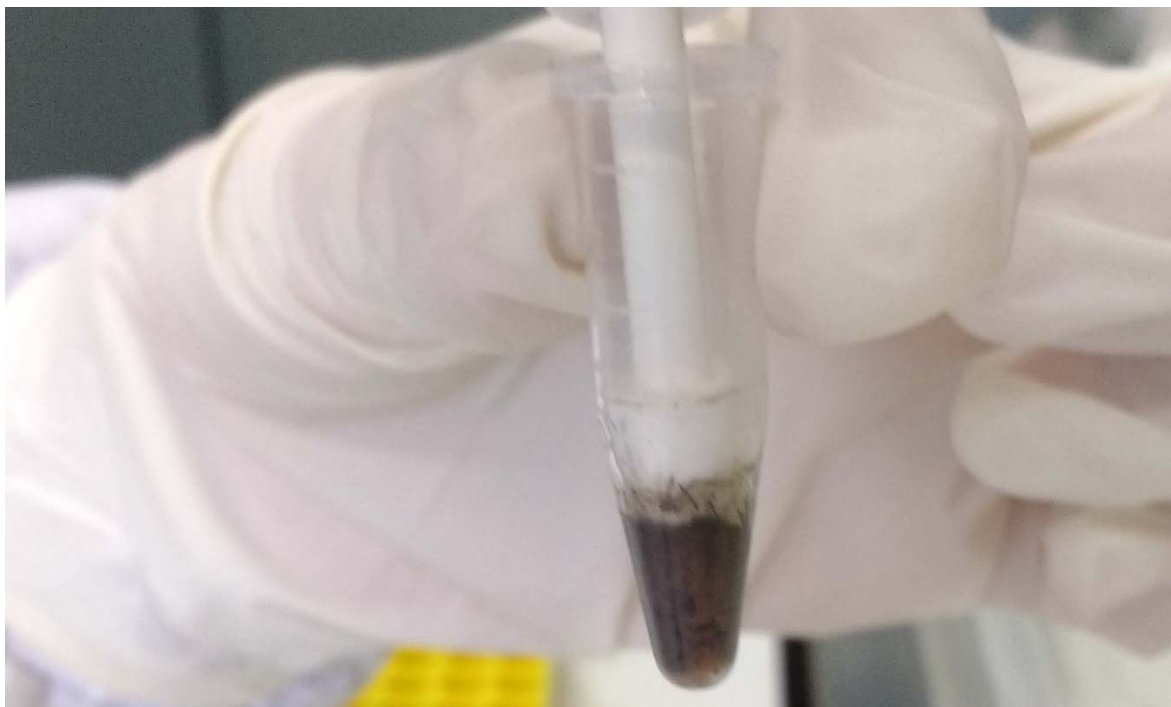


FONTE: O autor (2016)

3.5 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

Para extração do RNA viral cada pool foi macerado utilizando 450 μ L de tampão PBS (FIGURA 28) e centrifugado por 30 minutos a 6.000 rpm e 0°C. De 140 μ L do sobrenadante do macerado de mosquitos foi extraído o RNA viral utilizando o kit QIAamp® Viral Mini Kit (QIAGEN Inc.,Valencia, CA) conforme instruções do fabricante.

FIGURA 28 MACERAÇÃO COM PISTILO DOS MOSQUITOS COLETADOS EM FOZ DO IGUAÇU



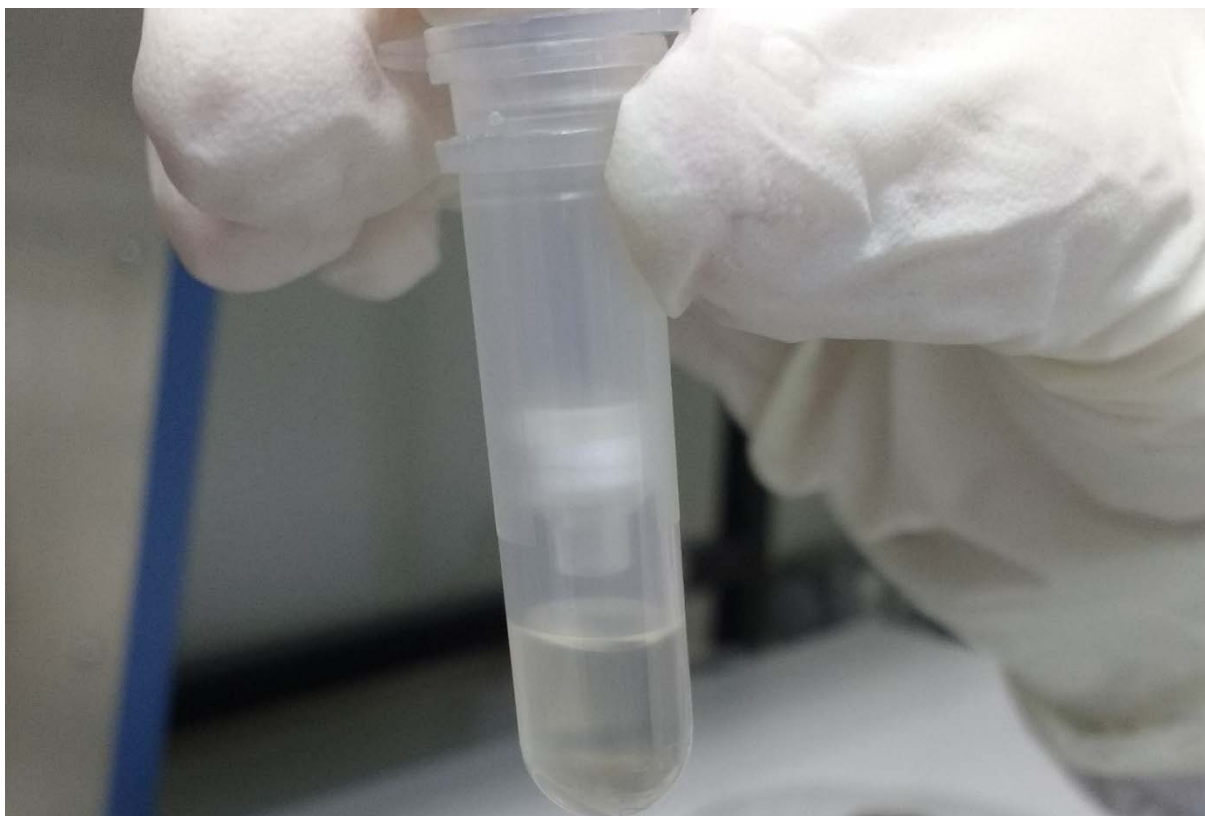
FONTE: O autor (2016)

Em microtubos foram adicionados 140 μ L da amostra a 560 μ L de tampão AVL. Em seguida, a solução foi agitada durante 15 segundos e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 560 μ L de etanol (96-100%), agitando durante 15 segundos. Foram adicionados 630 μ L da mistura contendo a amostra, tampão AVL e etanol aos tubos coletores. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto, e o filtrado dos tubos coletores, descartado. Foi adicionado o restante da mistura ao tubo e uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de tampão AW1, sendo as amostras centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto. O filtrado contido nos tubos coletores foi descartado, e o volume de 500 μ L do tampão AW2 foi adicionado a coluna do tubo coletor.

Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos, após uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 min. Os tubos coletores foram posicionados no interior de um microtubo de 1,5 mL estéril e devidamente identificado, sendo em seguida adicionados 50 μ L de tampão de eluição AVE. As amostras foram incubadas durante 1 minuto e centrifugadas a 8.000 rpm para

recuperação do RNA aderido à membrana da coluna. O RNA obtido foi usado imediatamente para obtenção do DNA complementar (cDNA) ou preservado a -70°C (FIGURA 29).

FIGURA 29 COLUNA COM RNA EXTRAÍDO PARA QUANTIFICAÇÃO NO LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA MÉDICA E VETERINARIA - UFPR



FONTE: O autor (2016)

A quantificação do RNA viral extraída foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®.

3.6 ANÁLISE POR RT PCR

A técnica RT-PCR onde envolve dois ciclos de reação, a transcrição reversa e a amplificação por reação em cadeia da polimerase, que se mostra mais sensível na detecção de uma eventual dupla infecção, e sua análise foi realizada baseado por Bona (2011) e Rocha (2015).

Numa primeira etapa da RT-PCR, o RNA viral é transcrito em cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa e o primer que serve como molde inicial.

Os nucleotídeos são utilizados para continuar a cadeia polipeptídica. A próxima etapa é a amplificação da fita dupla de cDNA com o auxílio da enzima Taq DNA polimerase. Esta enzima é ativa em altas temperaturas e inativa em temperaturas menores. Por sua vez a fita dupla DNA se solta e permite a ligação da enzima Taq DNA polimerase em cada uma das fitas, formando duas novas fitas duplas e assim sucessivamente.

Para realização de transcrição reversa e obtenção do cDNA, foi utilizado 2000 ng de RNA viral + 1 µL de primer Flav 200R 50 pmol – incubados em termocilador por 5 minutos a 70°C. Em seguida colocado em banho de gelo e adicionado 5 µL de tampão 5x, 2,5 µL de dNTP (10 mM), 30 µL de AMV Reverse Transcriptase e água Milli-Q autoclavada para completar 25 µL. Posteriormente incubou-se em termociclador por uma hora a 42°C e em seguida a 95°C por 10 minutos.

Ao final da reação, 3 µL de cDNA, 2,5 uL de tampão 10x, 1 µL de primer Flav 200R e Flav 100R (20 pmol), 1,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,6 µL de Taq DNA polimerase e 14,9 µL de água Milli-Q autoclavada foram submetidos a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por um minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, ao final 72°C por 10 minutos. Na sequência 5 µL da amostra foi utilizada para corrida eletroforética em gel de poliacrilamida durante uma hora e trinta minutos. Posteriormente o gel foi visualizado em aparelho transiluminador.

3.7 GEOREFERENCIAMENTO

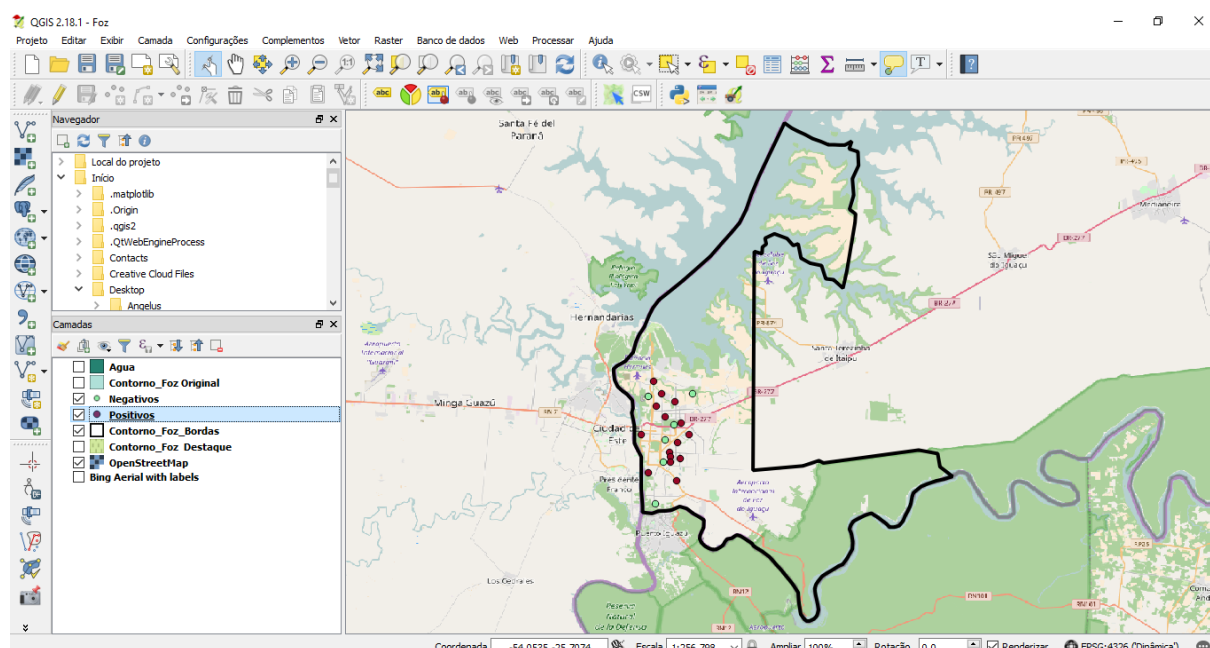
As armadilhas foram georreferenciadas, e detectada a presença de flavivírus pela análise de PCR. Os dados da identificação dos mosquitos foram utilizadas para se estabelecer o local onde há circulação do vírus, neste estudo a ferramenta utilizada foi a QGIS (Quantum Geographic Information System) versão 2.18.1 (64 bits) versão “Las Palmas” para computadores sistema Windows, juntamente com a versão para dispositivos android (celulares e tablets) chamada de QGIS Experimental versão 2.14.6 LTR, as ferramentas QGIS utilizam o GPS para precisar os dados e são de livre acesso e uso.

Os mapas foram confeccionados tendo como raster de fundo, mapas da plataforma OpenStreetMap, as divisões de setores foram vetorizadas pelo autor, assim como as camadas e pontos de interesse. Durante a confecção das cartas foi

averiguado que utilizar os mapas da plataforma open streetMap em tempo real foram forneceram uma melhor resposta para os computadores testados (versão Windows). O único ponto negativo foi a necessidade de acesso à internet a todo tempo para visualização plena das camadas raster. O Sistema de Referência de Coordenadas (SRC) utilizado foi o WGS84, pois permitia o lançamento de coordenadas pelo sistema Longitude x Latitude compatível com grande parte dos GPS's para dispositivos moveis do mercado.

Foram plotados os dados e testado o uso do software, bem como complementos ao software como OpenLayersPlugIn, NumericalDigitize e OSMInfo, que auxiliaram na plotagem da região indicada aproximada onde foram capturados os mosquitos (FIGURA 30).

FIGURA 30 DADOS PLOTADOS NO SOFTWARE QGIS



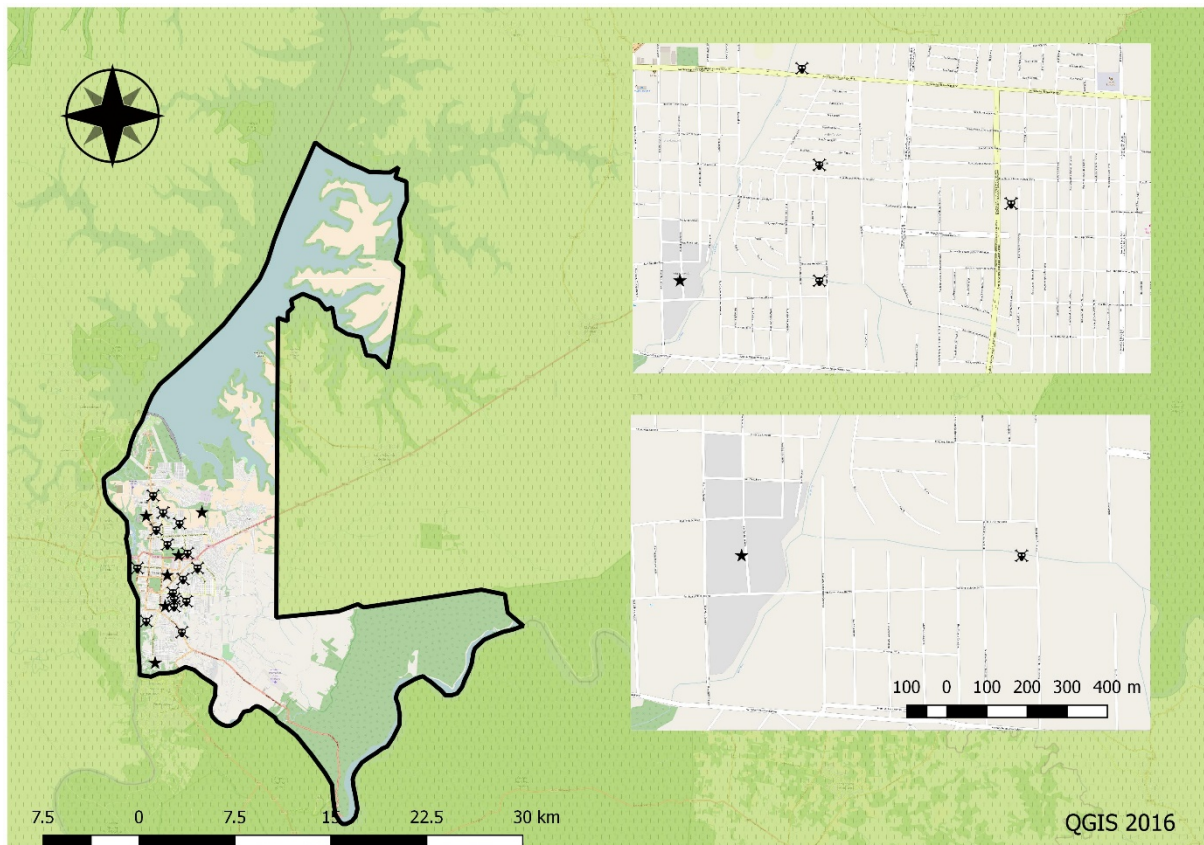
NOTA: Os pools em vermelho são considerados positivos, em verde negativo, a precisão dos pontos é aproximada pois os dados das armadilhas foram remetidas por estrato.

FONTE: O autor (2016)

Cada armadilha ganhou uma camada específica, para consulta bem como um grupo para armazenamento de dados posteriores.

Por fim os dados foram transformados em mapas georeferenciados com o software Compositor (FIGURA 31).

FIGURA 31 CARTA GEOREFERENCIADA DE FOZ DO IGUAÇU E ESTRATO POSITIVO E NEGATIVO AMPLIADO



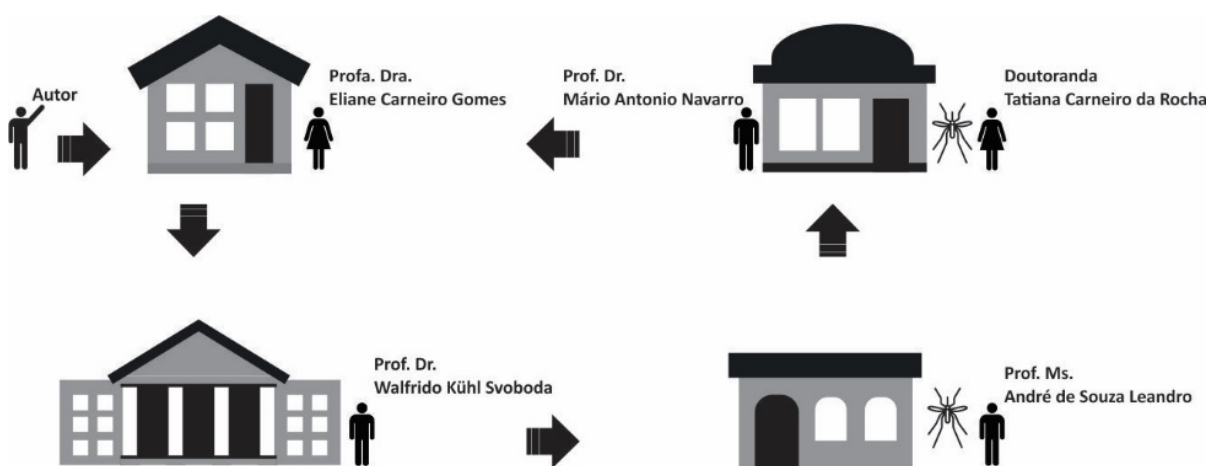
LEGENDA: (Caveiras) positivos e (Estrelas) negativos

FONTE: o autor (2016) via software QGIS e Compositor

3.8 REDE DE CONHECIMENTO E COLETA DE MATERIAL

O presente trabalho foi realizado em cooperação de diversas pessoas e departamentos. Deste da elaboração da idéia primordial do projeto pela Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes e Prof. Dr. Walfrido Kühl Svoboda foi feito todo o intercâmbio entre o Laboratório de Saude Publica e Ambiental da Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal da Integração Latino-Americana e Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu onde pela colaboração do Prof. Ms. Andre Leandro foi feita a captura e envio dos mosquitos para o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Neste laboratório com o auxilio do Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva e da doutoranda Tatiana Carneiro da Rocha foram processados os mosquitos capturados. Por fim os dados retornaram ao laboratorio de Saude Publica e Ambienal para consolidação (FIGURA 32).

FIGURA 32 REDE DE CONHECIMENTO E COLETA DE MATERIAL DO PROJETO



NOTA: A imagem ilustra a rede base do projeto, mas outras instituições e pessoas também contribuíram.

FONTE: O autor (2016)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, são continuamente estudados pois tem uma grande relevância para saúde pública em virtude da capacidade de transmitir doenças, o fato de serem cosmopolitas e terem uma grande facilidade de adaptação os fazem versáteis para em uma faixa considerável do planeta, entretanto os estudos necessitam ser realizados em microrregiões e os dados amplamente difundidos para uma caracterização precisa do desenvolvimento, extensão e áreas propensas ao avanço dos vetores.

A região de Foz de Iguaçu – PR se mostrou uma ótima área de estudo pois reúne os fatores considerados ideais para a proliferação dos vetores como temperatura, umidade, topografia, reservatórios naturais/artificiais para a ovoposição, em virtude da grande circulação de pessoas por ser uma cidade turística há também uma diversidade em opção para repasto, pode ser uma porta para o transporte indireto do vetor e outros agentes patógenos, sendo uma cidade propensa a emergência ou reemergência de doenças. Como a cidade é fronteira com outros dois países (Argentina e Paraguai) onde as medidas de prevenção e combate as zoonoses são diferenciadas é um fator importante para manter os sistemas de vigilância epidemiológicas operando sem interrupções, bem como o pronto combate.

O presente estudo verificou que o uso das armadilhas onde é possível resgatar o vetor mantendo sua integridade é satisfatória, pois facilita sua contagem, identificação, análise do vetor por completo e sem contaminação de agentes autocolantes ou de atração. A armadilha é de fácil manejo e usa apenas água como fator de atração o que repete com exatidão os criadouros artificiais, sua estrutura promove a captura com viés muito remoto do vetor conseguir escapar, vale ressaltar que segundo ACE's o aceite da população em relação a instalação das armadilhas é muito bom e que a mesma é esteticamente "bonita".

A transferência dos mosquitos em tubos de ensaio, identificação e limpeza das armadilhas no local dá um dinamismo a operação de captura, fazendo a armadilha ficar ativa o tempo todo. O armazenamento dos tubos com vetores por congelamento em câmara de nitrogênio também se mostrou eficaz para o transporte, bem como o uso de mesa refrigerada para o descongelamento e triagem, evitando que temperaturas elevadas proporcionassem alteração das condições ideais para análise.

O uso da RT-PCR é uma ferramenta de caracterização rápida e otimizada já consolidada há anos para a detecção de vírus. No estudo foi possível analisar 21 pools. Destes 15 apresentaram resultados positivos para Flavivírus que equivale a 72% das amostras (TABELA 4). Também foi verificado que a utilização do primer genérico para Flavivírus apresentou uma boa resposta aos controles positivos e pools, além de potencialmente detectar outros Flavivírus que não detêm destaque neste estudo. Os resultados indicaram um alto índice de pools positivos por toda cidade de Foz do Iguaçu o que demanda um cuidado amplo e constante em relação ao vetor e suas doenças. A detecção por gênero e não espécie viral é interessante pois o espectro de detecção é maior e com custo menor dispensando a caracterização por espécie, pois não é encontrado na literatura alguma espécie de Flavivírus benéfica ao homem.

TABELA 4 IDENTIFICAÇÃO DO POOL E SEU RESULTADO POSITIVO OU NEGATIVO PARA FLAVIVÍRUS EM MOSQUITOS DE FOZ DO IGUAÇU

Nº Pool	Resultado	Nº Pool	Resultado
1	Negativo	11	Positivo
2	Positivo	12	Negativo
3	Positivo	13	Positivo
4	Positivo	14	Positivo
5	Positivo	15	Positivo
6	Positivo	16	Positivo
7	Positivo	17	Positivo
8	Positivo	18	Negativo
9	Positivo	19	Negativo
10	Negativo	20	Negativo
		21	Positivo

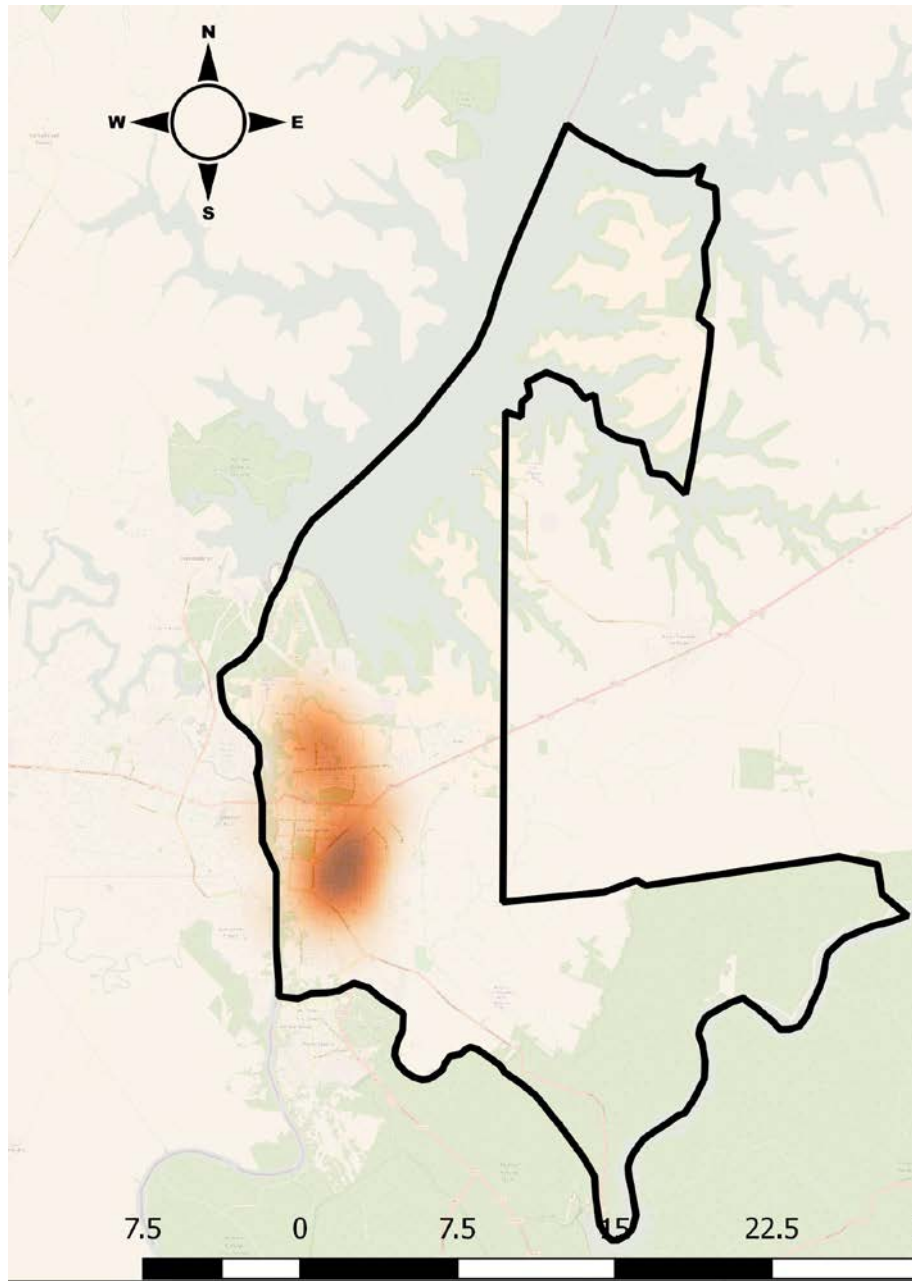
NOTA: Foi considerado positivo as amostras que apresentaram bandas próximas as bandas dos controles e negativo as bandas inexistentes ou longe das bandas de controle.

FONTE: O autor (2016)

Com os dados obtidos foi possível gerar um mapa de calor que são bastante apropriados para visualizar grandes quantidades de dados multidimensionais e podem ser utilizados para identificar grupos e concentrações. Neste estudo o mapa de calor criado mostra onde foi encontrada uma maior concentração de armadilhas positivas dentro da região central (FIGURA 33) está com alta concentração de hotéis,

restaurantes e comércios em geral. Vale a pena destacar que na região indicada com alta concentração de armadilhas positivas se encontra também um zoológico e um quartel que detêm de grandes espaços físicos.

FIGURA 33 MAPA DE CALOR DAS ARMADILHAS POSITIVAS



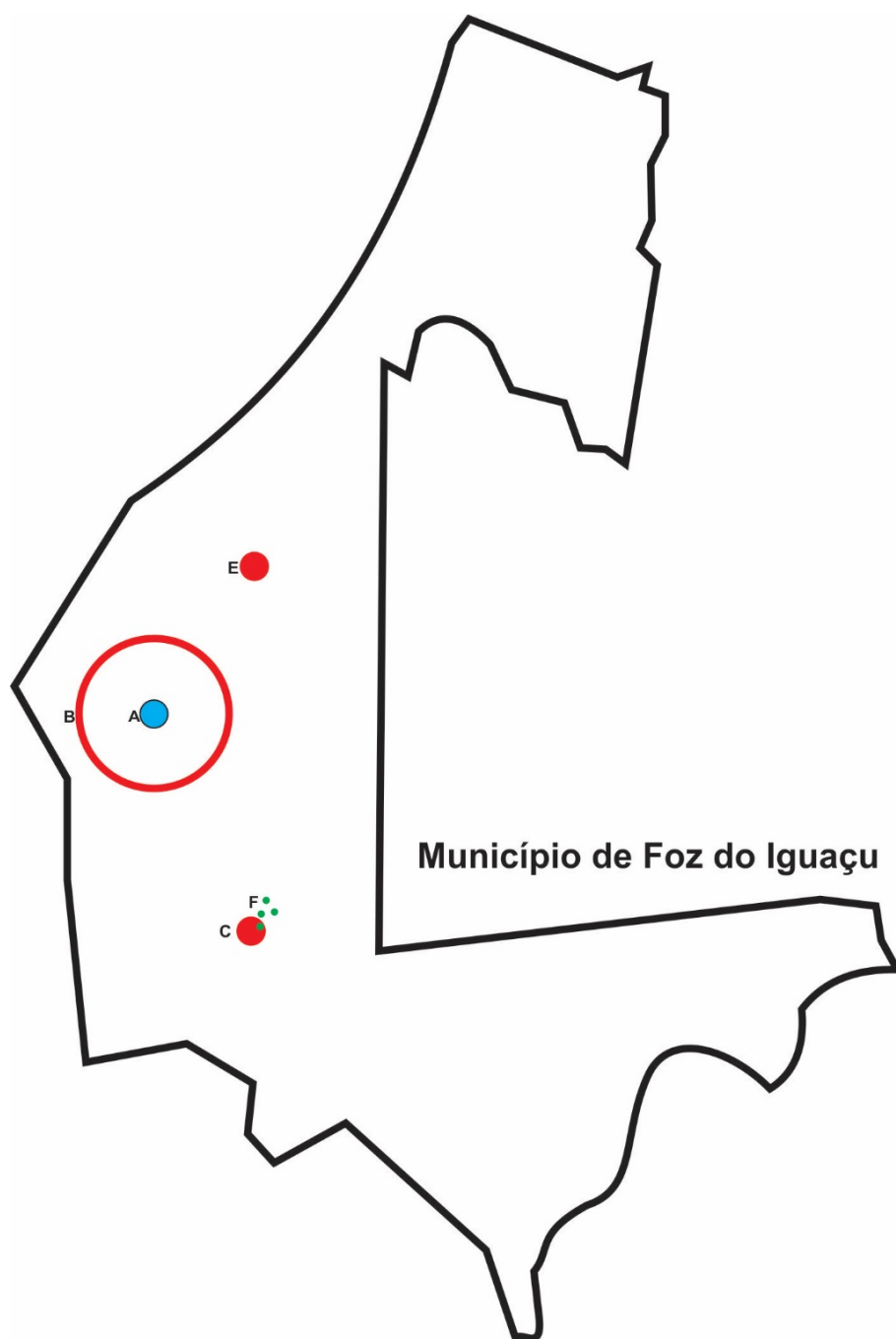
NOTA: Região com o gradiente vermelho mais acentuado é a região de maior concentração de armadilhas positivas.

FONTE: O autor (2016) com auxílio das ferramentas QGIS e Excel.

Realizar diagnósticos precoces via RT-PCR assim que os vetores forem capturados e enviados ao laboratório pode reduzir o número de casos das arboviroses, se o mesmo for praticado de forma constante e realizado por pessoal capacitado. Uma armadilha acusando resultado positivo o bloqueio pode ser realizado como preconiza o Ministério da Saúde. Até o presente momento é verificado que o bloqueio é concretizado apenas vários dias depois que a pessoa foi até a unidade de saúde e é confirmada a doença. Nesse tempo o vetor pode facilmente se distanciar da área de bloqueio, fazer o repasto e oviposição em locais onde o bloqueio não fará efeito, com o mosquito longe da área de atuação do bloqueio o potencial de circulação é aumentado. Também é verificado que o bloqueio é realizado com base a residência do indivíduo infectado, sabendo que o mesmo pode ter sido infectado em outro lugar, somando com o tempo esparso entre a picada e a efetiva notificação ao CCZ para efetuar as ações. Isso compromete a eficiência do bloqueio (FIGURA 34).

Uma varredura das armadilhas, análises e contato rápido com o CCZ e seus ACE's pode afetar de forma positiva na saúde pública, resultando na redução do número de transmissões por arbovírus.

FIGURA 34 SIMULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU EM SITUAÇÃO DE CONTAGIO EM PONTOS DE INTERESSE.



NOTA: Os pontos são virtuais apenas para demonstração do que pode ocorrer, as áreas foram aumentadas em 100x para ocorrer uma boa visualização no impresso.

LEGENDA: (A) Área notificada após vários dias da transmissão domicílio e área com o bloqueio realizado, (B) Área onde o vetor pode ter se deslocado até o momento do bloqueio, (C) Área onde a pessoa realiza funções laborais, (E) Área onde a pessoa realiza funções de lazer e (F) Pontos com armadilhas positivas.

FONTE: O autor (2016)

O uso de ferramentas de georreferenciamento pode auxiliar na rápida resposta necessária as equipes de combate e bloqueio ao vetor, uma vez que, após a análise confirmada a armadilha positiva, podem ser estudadas estratégias de combate e bloqueio de forma dinâmica, eficiente e precisa, além de estudos comportamentais por região a fim de antecipar com medidas preventivas de forma aguda em regiões chave. Esta estratégia ela tem custo baixo uma vez necessitando pessoal devidamente treinado para usar todo o potencial da ferramenta.

Através do georeferenciamento podemos verificar as regiões endêmicas, bem como aspectos sócias e naturais, criar uma base de dados para um controle pontual de ações aproveitando melhor os ACE's, reduzindo custos em combate com o efeito crônico de redução das transmissões, o que desencadeia uma redução na procura de atendimentos no SUS.

Na literatura existem várias discussões sobre o modo correto ou mais efetivo de combate às arboviroses. Existe um consenso que deve ser promovido sistemas ágeis de reconhecimento do problema e compartilhamento em curto prazo, além de estabelecer uma vigilância permanente em regiões onde são caracterizadas a emergência ou reemergencia de arboviroses. Tudo deve estar devidamente atrelado com boas estratégias de prevenção, boa infraestrutura e pessoal capacitado, somado aos esforços do município, estado e país.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As armadilhas que atraem e mantem os insetos intactos e/ou vivos foram satisfatórias, o que pode ser observado nos lugares estratégicos de sua implantação.

O diagnóstico de infecção vetorial dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* com a técnica de RT-PCR revelou uma ampla circulação de flavivírus em toda região de Foz do Iguaçu.

O primer genérico também se mostrou satisfatório na detecção.

A técnica de RT-PCR permite identificar com antecedência e confiabilidade flavivírus circulante na cidade de Foz do Iguaçu, podendo ser utilizada como ferramenta para o monitoramento da circulação viral nos mosquitos vetores, reforçando a necessidade do desenvolvimento de estratégias mais eficientes e mais rápidas visando o bloqueio da transmissão em tempo hábil a fim de evitar epidemias.

Os dados obtidos podem ser usados para estudos epidemiológicos, assim como os pontos estratégicos para o bloqueio pode ser aprimorado.

O uso de ferramentas de georreferenciamento, podem auxiliar e dinamizar as operações de prevenção, controle e combate as arboviroses, além do baixo custo de implantação.

Todos os serviços descritos podem ser usados de forma complementar no serviço de controle de zoonoses e saúde pública.

Dentre os objetivos traçados ao trabalho, foi realizada a investigação da presença de flavivírus em mosquitos na localidade de Foz do Iguaçu, Paraná, todos os objetivos propostos foram realizados.

6 REFERENCIAS

- ALLAN, S. A.; KLINE, D. L. Larval rearing water and preexisting eggs influence oviposition by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 6, p. 943–947, nov. 1998.
- ALMEIDA, P. G. Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 6, p. 961–74, 2011.
- BADEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.
- BALM, M. N. D. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, 2012.
- BARTH, O. M. **Atlas of Dengue Viruses: Morphology and Morphogenesis**. [s.l: s.n.].
- BARTON, M. A.; SALVADORI, M. I. **Zika virus and microcephaly** CMAJ, 2016.
- BEATY, B.; STEPHEN, H. Natural Cycles of Vector-Borne Pathogens. In: **Biology of Disease Vectors**. [s.l: s.n.]. p. 168–185.
- BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R. **Adolpho Lutz - Entomologia**. [s.l.] SciELO - Editora FIOCRUZ, 2006.
- BESERRA, E. B. et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 853–860, 2006.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 13, 2014.
- BLACK IV, W. C. et al. **Flavivirus susceptibility in Aedes aegypti**. Archives of Medical Research. **Anais...**2002
- BONA, A. C. D.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos. **Boletín de Malariologia y Salud Ambiental**, v. 51, n. 2, p. 107–116, 2011.
- BONALDO, M. C. et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of

Patients in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, 2016.

BRASIL. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 3ª edição ed. [s.l.] Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. 8ª ed. Brasília: [s.n.].

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Brasil 2010**, 2011a.

BRASIL. Febre de Chikungunya manejo clínico Febre de chikungunya: manejo clínico. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.**, p. 28, 2015.

BRASIL, F. N. DE S. Programa Nacional de Controle da Dengue. **Vigilância Epidemiológica**, p. 34, 2002.

BRASIL, M. D. S. Dengue, Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - Manual de Normas Técnicas. p. 75, 2001.

BRASIL, M. DA S. **O Agente Comunitário de Saúde no controle da dengue**. [s.l.: s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Plano Nacional de Saúde – PNS 2012-2015**. [s.l.: s.n.].

BRASIL, P. et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The Lancet**, v. IN PRESS, n. 10026, p. 1482, 2016.

BRECHER, M.; ZHANG, J.; LI, H. The flavivirus protease as a target for drug discovery. **Virologica Sinica**, v. 28, n. 6, p. 326–336, 2013.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg - 26.ed.:** . [s.l.] AMGH Editora, 2014.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 21, n. 10, p. 1885, 2015.

CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology (Standard Edition)**. [s.l.] Elsevier Science, 2005.

CARTER, J.; SAUNDERS, V. A. **Virology: Principles and Applications**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2007a.

CARTER, J.; SAUNDERS, V. A. **Virology: Principles and Applications**. [s.l.] Wiley,

2007b.

CASSEB, A. D. R. et al. Arbovírus: Importante Zoonose Na Amazônia Brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391–403, 2013.

CDC. Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States. **Centres for Disease Control and Prevention.**, 1994.

CDC/EUA. Zika Virus. **Web**, p. 2–4, 2015.

CECÍLIO, S. G. et al. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae from southeastern Brazil. **Journal Of Vector Ecology: Journal Of The Society For Vector Ecology**, v. 40, n. 1, p. 71–74, jun. 2015.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. **Dengue and chikungunya infections in travelers. Current opinion in infectious diseases**, 2010.

CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l: s.n.].

CORBET, P. S.; CHADEE, D. D. An improved method for detecting substrate preferences shown by mosquitoes that exhibit “skip oviposition”. **Physiological Entomology**, v. 18, n. 2, p. 114–118, 1993.

COSTA, C. N. et al. combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador , Bahia Impact of action against *Aedes aegypti* in the city of Salvador , Bahia. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 5, p. 108–115, 2002.

CRUZ, A. C. R.; VASCONCELOS, P. F. D. C. Arbovírus No Brasil. **Biológico**, v. 70, n. 2, p. 45–46, 2008.

DA CARNEIRO ROCHA, T. et al. Evaluation of arboviruses of public health interest in free-living non-human primates (*Alouatta* spp., *Callithrix* spp., *Sapajus* spp.) in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 143–148, 2015.

DA SILVA NETO, M. A. C.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. **Topicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. [s.l.] Itabajara da Silva Vaz Junior, 2013.

DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DONATTI, J. E.; GOMES, A. DE C. **Adultrap: descrição de armadilha para adulto de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)** *Revista Brasileira de Entomologia* scielo , , 2007.

DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016.

EISEN, L. et al. Proactive Vector control strategies and improved monitoring and evaluation practices for dengue prevention. **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 6, p. 1245–1255, nov. 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224–229, 2007.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. UFSM ed. [s.l: s.n.].

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2**. [s.l.] EDUSP, 2002.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento de Aedes aegypti. **Rev. Brasil. Malariol. Doenças trop.**, v. 37, p. 29–36, 1985.

GANU, M. A.; GANU, A. S. Post-chikungunya chronic arthritis--our experience with DMARDs over two year follow up. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 59, p. 83–86, fev. 2011.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 2, p. 269–273, 2016.

GOMES, A. DE C. Vigilância entomológica. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 11, 2002.

GOMES, A. DE C. et al. [Specificity of the Adultrap for capturing females of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 216–219, 2007.

GOMES, A. DE C. et al. **Estimação da infestação predial por Aedes aegypti (Díptera: Culicidae) por meio da armadilha Adultrap** *Epidemiologia e Serviços*

de Saúde scielo , , 2008.

GRATZ, N. G. Critical review of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, p. 215–227, 2004.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, jul. 1998.

GUBLER, D. J. et al. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, 2nd Edition**. [s.l.] CABI, 2014.

GUEDES, D. R. D.; AYRES, C. F. J. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**. [s.l.: s.n.].

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. SUPPL. 1, 2010.

HACKELOEER, A. et al. Georeferencing: a review of methods and applications. **Annals of GIS**, v. 20, n. 1, p. 61–69, 2014.

HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of American mosquito control association**, v. 4, p. 1–39, 1988.

HAYES, E. B. **Zika virus outside Africa** **Emerging Infectious Diseases**, 2009.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376–396, 1990.

HOLMES, E. C.; BARTLEY, L. M.; GARNETT, G. P. 10 The Emergence of Dengue: Past Present and Future. **Biomedical Research Reports**, v. 1, n. C, p. 301–325, 1998.

IOOS, S. et al. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics** **Medecine et Maladies Infectieuses**, 2014.

JUNIOR, V. L. P. et al. Vírus Zika : Revisão para Clínicos Zika Virus : A Review to Clinicians. v. 28, n. 6, p. 760–765, 2015.

KNIPE, D. M. et al. **Fields virology**. 6th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

KORSMAN, S. N. J. et al. **Virology: An Illustrated Colour Text**. [s.l.] Elsevier Health Sciences UK, 2012.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 71–92, 2008.

LEUNG, G. H. Y. et al. ZIKA VIRUS INFECTION IN AUSTRALIA FOLLOWING A MONKEY BITE IN INDONESIA. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 46, n. 3, p. 460–464, maio 2015.

LI, M. I. et al. Oral Susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

LONGO, D. L. et al. **Manual de Medicina de Harrison - 18ed.** [s.l.: s.n.].

LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, p. 229–243, 2002.

MAIRUHU, A. T. A. et al. **Dengue: An arthropod-borne disease of global importance** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2004.

MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 948, p. 588–601, 2004.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–8, 2016.

MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde.** [s.l.] IOC, 2010.

MOORE, C. G. et al. Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. p. 85, 1993.

MOREIRA, L. A. et al. A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–1278, dez. 2009.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 1, p. 7–15, 1995.

MOURAO, M. P. G. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48 Suppl 1, p. 20–26, 2015.

- MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 14, 2014.
- MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, fev. 2015.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595--O596, 2014.
- NASCI, R. S.; HARE, S. G.; WILLIS, F. S. Interspecific mating between Louisiana strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the field and laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 3, p. 416–421, set. 1989.
- NEMÉSIO, H.; PALOMARES-JEREZ, F.; VILLALÁIN, J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: Membranotropic regions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 11, p. 2818–2830, nov. 2012.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014.
- OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, jan. 2016.
- PADBIDRI, V. S.; GNANESWAR, T. T. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. **Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology**, v. 23, n. 4, p. 445–451, 1979.
- PANAM, S. P. Plan Continental de ampliación e intensificación del combate a *Aedes aegypti*. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 3, n. 2, p. 124–130, fev. 1998.
- PARANÁ. Mineropar: Serviço Geológico do Paraná. **Atlas Geomorforológico Paraná**, 2006.
- PERERA, R.; KUHN, R. J. **Structural proteomics of dengue virus** *Current Opinion*

in **Microbiology**, 2008.

PRITCHARD, L. I.; GOULD, A. R. Phylogenetic comparison of the serotype-specific VP2 protein of bluetongue and related orbiviruses. **Virus research**, v. 39, n. 2–3, p. 207–220, dez. 1995.

QI, R.; ZHANG, L.; CHI, C. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 91–101, 1 fev. 2008.

RAI, K. S. *Aedes albopictus* in the Americas. **Annual review of entomology**, v. 36, p. 459–484, 1991.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, p. 1–7, 2016.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. **Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010.

ROSEN, L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 37, n. 2, p. 398–402, set. 1987.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars in pediatric neurology**, v. 19, n. 3, p. 130–151, set. 2012.

SÃO PAULO, S. DE E. DA S. Dengue - Cartilha do Gestor Municipal. 2014.

SCHATZMAYR, H. G. Viroses emergentes e reemergentes. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S209–S213, 2001.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245–246, 1986.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, jul. 2010.

SENEVIRATNE, S. L.; MALAVIGE, G. N.; DE SILVA, H. J. **Pathogenesis of liver**

involvement during dengue viral infections **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2006.

SILVA, L. J.; ANGERAMI, R. N. **Víroses emergentes no Brasil**. [s.l.] SciELO - Editora FIOCRUZ, 2008.

SOARES DE OLIVEIRA-SZEJNFELD, P. et al. Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. **Radiology**, p. 161584, 2016.

STAIKOWSKY, F. et al. Prospective Study of Chikungunya Virus Acute Infection in the Island of La Réunion during the 2005–2006 Outbreak. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7603, 28 out. 2009.

SWAMINATHAN, S. et al. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **New England Journal of Medicine**, v. 0, n. 0, 2016.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S99–S102, 2001.

TEVA, A. et al. **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde**. [s.l: s.n.].

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Arbovirus Research in the Brazilian Amazon. **Tropical Animal Science**, p. 4–9, 1989.

TSETSARKIN, K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Nature communications**, v. 5, p. 4084, 2014.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 523–540, jul. 2009.

WHO. World Health Organization. **Arboviruses and Human Disease**, p. 84, 1967.

WHO. World Health Organization. **Arthropod-borne and rodent-borne viral**

diseases. Rep technical report series, v. 719, p. 1–116, 1985.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. 147, 2009.

WHO. **Dengue and severe dengueWHO Fact Sheet**, 2012. Disponível em:
<www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.